

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-65791

(P2000-65791A)

(43) 公開日 平成12年3月3日(2000.3.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード(参考)
G 0 1 N	27/416	G 0 1 N 27/46	3 8 6 Z
	27/414	27/30	3 0 1 W
	27/333		3 0 1 L
	27/327		3 0 1 M
			3 3 1 F

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-38753	(71) 出願人	590022306
(22) 分割の表示	特願平2-500757の分割		アイースタット コーポレーション
(22) 出願日	平成1年11月13日(1989.11.13)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州
			08540, プリンストン, カレッジ ロー
(31) 優先権主張番号	2 7 0 1 7 1		ド 303
(32) 優先日	昭和63年11月14日(1988.11.14)	(72) 発明者	コゼット, ステファン, エヌ.
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		カナダ国 オンタリオ ケー2エッチ 5
(31) 優先権主張番号	3 8 1 2 2 3		シー6, ネビアン, リッチモンド ロー
(32) 優先日	平成1年7月13日(1989.7.13)		ド 3922
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	4 3 2 7 1 4		弁理士 平木 祐輔 (外2名)
(32) 優先日	平成1年11月7日(1989.11.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 完全マイクロ加工バイオセンサーのための

マイクロ施与システム

(57) 【要約】

【課題】 完全マイクロ加工バイオセンサーのためのマイクロ施与システムを提供する。

【解決手段】 実質的に平らな表面に分配層を確立する方法であって：(a)最適化された表面張力および粘度特性を有する流体組成物を調製し；(b)細長い部材および針先を含む微量注射器針と前記針先に予め定められた量の小滴を形成させる手段を含む可動性微量注射器組立品に前記流体組成物を装填し；(c)場合により、前記表面の界面自由エネルギーが希望の範囲内となるよう前処理を行い；(d) 前記針先の小滴を表面の所定領域と接触させ；(e) 前記表面に予測かつ再現可能な寸法をもつ前記流体組成物の分配層を与える方法で前記小滴が前記針先から離れるように前記組立品を前記表面から引き離す；ことから成る上記方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に平らな表面に分配層を確立する方法であって：

(a) 可動性の微量注射器組立品に装填するのに適した、最適化された表面張力および粘度特性を有する流体組成物を調製し；

(b) (i) 前記流体組成物を貯留するための貯蔵所、(ii) 細長い部材および針先を含む微量注射器針、(iii)

前記貯蔵所が前記微量注射器針から移される場合は、前記流体組成物を前記貯蔵所から前記微量注射器針へ搬送するための手段、(iv) 制御された量の前記流体組成物を強制的に前記細長い部材の中を通過させて、前記針先に予め定められた量の小滴を形成させる手段、および(v) 前記小滴が実質的に平らな表面の所定領域と接触しうるように前記組立品の多方向移動を制御するための手段から成る前記可動性微量注射器組立品に前記流体組成物を装填し；

(c) 場合により、前記表面の界面自由エネルギーを希望の範囲内にするのに十分な条件下で前記表面を露現処理し；

(d) 前記針先の小滴を前記表面の所定領域と接触させ；そして

(e) 前記表面に予測できかつ再現できる寸法をもつ前記流体組成物の分配層を有する方法で前記小滴が前記針先から離れるように前記組立品を前記表面から引き離す；

ことから成る上記方法。

【請求項2】 実質的に平らな表面は均一寸法のユニットセルの配列を有するウェッファから成る、請求項1の方法。

【請求項3】 前記ユニットセルは電流測定型および電位差測定型センサーより成る群から選ばれたベースセンサーを含む、請求項2の方法。

【請求項4】 前記ユニットセルは音波感知デバイス、サーモスター、ガス感知電極、電界効果トランジスタ、オプティカルウェンバーガイド、極微小電界センサー、および電導度センサーより成る群から選ばれたベースセンサーを含む、請求項2の方法。

【請求項5】 前記流体組成物は皮膚形成性ラテックスを含む、請求項1の方法。

【請求項6】 前記流体組成物は光形成可能な蛋白質複合物を含む、請求項1の方法。

【請求項7】 前記流体組成物は1種またはそれ以上の生物活性分子に含む、請求項5または6の方法。

【請求項8】 前記流体組成物はポリマーマトリックス、可塑剤、およびイオノホアを含む、請求項1の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、完全マイクロ加工

バイオセンサー、その大量生産のための方法および材料、および、種々の選択された分析種の存在および/または濃度の決定におけるその使用に関する。特に本発明の集積されたバイオセンサーは、生物活性な分子に相溶性であり、かつ、分析手法に特に適した材料を使用することにより、生物活性な分子が分析手法の基礎を提供することになる種々の生物活性な分子の組み込みを可能とした方法により製造し得る。本発明の集積されたバイオセンサーは、希釈されていない生物学的液体と完全に相溶性でもあり、非医学的のみならず、広範囲の医学的応用においても使用し得る。

【0002】より特定的には、本発明は新規な電気化学的アッセイ方法に関し、さらに、対象となる生物学的種(分析種)の存在および/または濃度を決定する際に有用な新規な完全マイクロ加工バイオセンサーに関する。本発明は、また、電極の操作電位においては検出可能な酸化又は還元を起こさないが基質転換体とは反応を生じ、その反応により検出可能な電気的に活性な種の濃度を変化させる、電気的に活性でない基質(以下、“基質”という)の新規な使用にも関係する。前記の濃度変化は測定可能でありかつ対象となる生物種の濃度に関連するものである。加えて、この発明はバイオセンサーのマイクロ加工法に関する。

【0003】本発明のアッセイ法およびバイオセンサーは、イムノアッセイを実施する際に有用なものとして例示される。かかるイムノアッセイは、また、基質転換体が酵素(アルカリホスファターゼ)であり、その酵素が基質(5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドキシルホスフェート)と反応して電気的に活性な種(ジオキシジェン(dioxygen)および過酸化水素)の濃度に変化を生じさせ、この変化がバイオセンサー、この場合にはイムノセンサー、により電気化学的に検出される場合に例として示される。サンドイッチアッセイおよび融合アッセイのいずれも、本発明の方法とバイオセンサーを使用して実施することができる。これらのアッセイにおいて、バイオセンサーの一端は、触媒電極と適宜な参照電極から成るベースセンサー、バイオセンサーの上に設置された粘着プロモータ層、およびこの粘着プロモータ層上に共役的に結合された対象となる免疫学的な分析種の受容体である生物活性層、とから成る。

【0004】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】血液または他の生物学的液体中の化学種の存在および/または濃度を測定する化学センサーの開発に多大の努力が費されてきた。これらのセンサーは試料のpHを測定するためのありふれた、台の頂部におく種類の巨大電極(非マイクロ加工のもの)であり、そして、時には、問題となった身体内に移徙するのに適したマイクロ電極の形態となり得るものである。この装置は現在のところ個別に製造されており、ある場合には手作業と、現在集積回路

を製造するのに使用されている薄フィルムおよびフォトレジストを含む製造法とを組み合わせて製造されている (例えば、Pace, S., *Sensors and Actuators* 1982, 1, 475; Zemel, J.N., 米国特許第4,302,530号明細書を参照のこと。後者は半導体装置上の“物質感受性 (substance-sensitive)”の光感定層、特に、イオン選択性電界効果トランジスタ (ion-selective field effect transistors: ISFET) の製造法を開示している)。この多大な、かつ連続的な努力にもかかわらず、この ISFET 手法に基づくセンサーは商業上一般的な物品とはなっていない。完全マイクロ加工バイオセンサー、即ち、主に薄フィルム手法およびマイクロ製造法により一般に大量生産され、臨床的な配置において有用であり、化学的および生物学的種のすべてのホストの検出および測定に適用するセンサーは成功裏には製造されていないというのが現状である。

【0005】商業的に存立するバイオセンサーの大量生産に関連する複雑さの度合は、当該分野の通常の専門家が認識するよりはるかに大変なものであることは明らかである。主な懸念は、既存の半導体製造方法に関する、固有の苛酷な物理学および化学的方法と、機能的な生物学的センサーの一部をなす敏感な有機化合物およびこれらや生物学的に活性な分子との相溶性である。Election の論文 (Election, M. *Electronics* 1986, June 2, 26-30) はマイクロセンサーに関する事項の現状について述べており、また、特定のイオン、ガス、および生物学的材料の検出を含む研究の活発な分野について簡単な記述をしている。電界効果トランジスタ (FET) の分野における進歩が記述され、現行の製造法の困難性および限界が論じられている。

【0006】他の多数の総説論文は、酵素または免疫的に活性な種を組み込んだ、イオン選択性電極 (ion-selective electrodes: ISEs) および ISFETs を有する種々の電気化学的装置を記述している (例えば、Pinkerton, T. C. および Lawson, B.L. *Clin. Chem.* 1982, 28(19), 1946-1955; Lowe, C.R. *Trends in Biotech.* 1984, 2(3), 59-65; Koryta, J. *Electrochim. Acta* 1986, 31(5), 515-520; De Young, H.G. *High Tech.* 1983, Nov., 41-50; Davis, G. *Biosensors* 1986, 2, 101-124 およびここで引用されている参考文献を参照)。また、酵素を基礎とするセンサーの操作の一般原則もレビューされている (Carr, P.W. および Bowers, L.D. *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, Wiley-Interscience (1980) を参照)。Racine, P. および Mindt, W. *Experientia Suppl.* 1971, 18, 525 による外部大量移動モデル (external mass-transfer model) を含む、種々の操作の数学的モデルが検討されてきた。しかしながら、特に非イオン性の種の分析のためのセンサーの製造に関して、右装置を製造する際の重要な問題および制限は依然克服されていない。イオン選択性電極 (IS

Es) に基づくバイオセンサーの大量生産は、これらのセンサーがイオン性ならびに非電解分析種の種の両方の分析のために容易に使用し得るから、特に有用である。現行の診断用セットにおいて、医療従事者は一般に全血液のような複雑な生物学的液体の1または複数の成分を分析することを要請していることに留意することも重要である。現在のところ、このような分析は装置の汚染を回避し、引き続いての測定を単純化するために、過速で遠心分離といった、一定量の全血液の処理を必要とする。しばしば血液試料は分析が実施される直方の中央施設に送られる。このため患者は貴重な情報が奪われ、多くの場合、何時間、時には、何日もこの情報を得ることができない。明らかに、もし、希釈していない試料について分析が実施できるならば、また、もしリアルタイムの測定を実施しうる装置またはセンサーが製造し得るならば、重要な利点を予見し得る。

【0007】2.1. 代表的な非マイクロ加工電極
多くのグルコースセンサーは、非マイクロ加工された、すなわち、“マクロ”電極を使用して構成されていることを指摘されるべきである (例えば、Fischer, U. および Abel, P., *Transactions of the American Society of Artificial Internal Organs* 1982, 28, 245-248; Roush, W., *Pflügers Archiv* 1984, 400, 348-402; Gehl, D.A., 米国特許第4,484,987号明細書; Abe, H. ら, 米国特許第4,515,584号明細書; Lunkes, E., 米国特許第4,679,562号明細書; および Skelly, P., 英国特許出願第2,194,843号)。しかしながら、上述の参考文献により開示された製造方法においては、薄フィルム処理の観点は何も記載されていない。

【0008】酵素ウレアーゼを含有する層とアンモニウムイオン選択性電極またはアンモニウムガス検知電極を組み合わせることが当該分野で既知である。かかる診断システムの最新の例は、Conover, G. らにより米国特許第4,713,165号明細書中に記載されている。このシステムにおいて、ニトロセルロース膜は酵素ウレアーゼの溶液中に浸され、この酵素は膜に吸着される。この酵素含有膜は乾燥状態においてアンモニウムISEの表面上に置かれる。製造されたマクロ電極装置は、血清、血漿、血液等の生物学的溶液中で血液尿素素 (blood urea nitrogen (BUN)) の測定を実行するために使用される。尿素センサーの製造のための初期のアプローチの他の代表的例は、Williams の米国特許第3,776,819号明細書に記載されている。従前の参考例と同様に、ウレアーゼの層はカチオン感知電極上に被覆され、この層はウレアーゼとゼラチン、フィブリンまたはアセチルバールから形成される。コロジオン (セルロース材料) またはセロファンから形成された外層の半透膜も一般的である。

【0009】2.2. 大量生産における従来の試み
ベースセンサーの単位セル、典型的には電極はシリコンウエハのような平面的な表面上に複製しうるが (Berge

Id, P., IEEE Transactions on Biomedical Engineering BME 1972, 19, 342-51). ベースセンサーに選択性と感受性を付与する複雑なセットの層を配置するための実行可能な方法が、報告されている集積回路処理技術と完全に両立するものであることは立証または示されていない。かかる複雑な層はイオン透過担体、酵素、抗体、抗原またはそれらの断片のような比較的これややすい生物学的分子を含有し、一般的には、機械的な操作には弱く、かつ、敏感である。このような層はウエハ上に適用されるが、その後の処理手段によるその不活化および/または破壊を防止することは容易にはし得ない、というのよ、かかる処理は通常ウエハを有機物質、強酸および塩基、および熱にさらしたり、このウエハを機械的攪拌、切断または刻みつけに処し、さらに、通常は、低圧水流ジェットを用いる洗浄工程を伴うからである。

【0010】これらのもろい層の破壊を防止するために、先行技術においては、バイオ層が確立される前に半導体ウエハを個々のベースセンサーに切断することが一般的に実行される。付加的なパッケージ処理（例えば、センサーをワイヤでコネクタに結合させる装置をカプセル化して十分な保護保護を受ける）も、生物学的に活性な層を適用する前に実施される。このような全体装置は、そのゆえ、部分的にのみ自動大量生産と両立する態様で、製造される。例えば、酵素ウレアーゼは1個の予めカプセル化されたイオン選択性の電界効果型トランジスタ（ISFET）のゲート上に配置される（Karube, I.ら、Analytica Chimica Acta 1986, 185, 195-200）。

【0011】ヨーロッパ特許出願第12,035号は、現行のFET装置の欠陥について十分な議論を提供しており、欠陥の最も重大なものは非イオン性の種の分析に対する限定された適用性である。電気化学と半導体技術を結合させる試みにおいて、小型化したマルチプルセンサーが1個のチップ上で形成された。しかしながら、この文獻の有用性は限定されている。なぜなら、この開示は単に一般的用語で述べており、機能性バイオセンサーのマイクロ加工方法を成功させるために重要な臨床的なバイオ層および保護バリアの可能な記述は何らなされていない。事実、バリウムイオン（カリウムイオンに感受性）またはノナクテン（アンモニウムイオンに感受性）を含有するセルロースおよびポリ（ビニルクロリド）（PVC）層等の材料のみが特定の開示されており、これらの物質の欠陥はバイオセンサー技術においては既に知られている。ISFsにおける使用のためのPVC層等に関する代表的論文には次のものがある：Davies, D.G. ら、Analyst 1988, 113, 497-500; Morf, W.E. Studies in Analytical Chemistry, Pungser, R. ら、(Eds), Elsevier, Amsterdam (1981) p264; Amann, D. Ion-Selective Microelectrodes, Springer (1986); Oesch, U. ら、Clin. Chem. 1986, 180, 290; Thomas J.D.R. 同上, 1986,

289 および Thomas, J.D.R. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 1986, 82, 1135.

【0012】また、日本の出版物を議論するメリットがある。日本出願第 61-234349号は全半導体上に架橋した層を設けるために、酵素と架橋剤の溶液で被覆されたFET半導体バイオセンサーを記載している。一般に使用されているフォトレジスト材料を別々に使用することが、所望の領域を引き続きのフロッピー処理から保護するために必要である。所望でないタンパク質の酵素による消化の信頼性は、信頼しえない、かつ不適当な寸法を制御しうることにより期待される。微小構造体を大量生産する際に、精密な寸法の制御は重要な考案である。日本出願第 61-283862号は、固体表面に酵素を含有するポリマー溶液を適用し、乾燥し、得られたフィルムにマスクを通して架橋剤を適用し、次いで、上記フィルムから架橋しなかった部分を除去することによって、酵素膜を固定するための方法を開示している。再び、この方法は通常のフォトレジスト手法の利点を得ることができず、乏しい解析パターンが得られるにすぎない。他の文獻である日本出願第 61-254845号は、センサーエレメントを酵素含有溶液に浸し、次いで、この膜を選択的に不活化するという、典型的なアプローチを採用している。

【0013】2.2.1. フォトパターンニング法
パターン化された膜を提供するために光感受性の合成ポリマーを使用することは既に知られている。例えば、グルコースオキシダーゼは、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）と2,5-ビス（4'-アゾ-2'-スルホベンゼン）シクロペンタノン（BASC）から成る光感受性の合成ポリマー混合物と混合される（Hanazato, Y. ら、Anal. Chim. Acta 1987, 193, 87; Hanazato, Y. ら、ヨーロッパ特許第228259号を参照）。得られた混合物は、次いで、単一のISFET装置上にパターン化された膜を形成させるために使用された。同等割合のグルコースオキシダーゼと牛血清アルブミン（BSA）が混合物として使用され、これが照射され、1〜3%のグルタルアルデヒド水溶液を使用して現像された。このシステムにおいて、マトリックスは合成光感受性ポリマーであり、著者は、約3mM以上のグルコース濃度でセンサーの応答が飽和すること、および、酵素の漏れまたは基剤中における変性により恐らく引き起こされる期間的に乏しい安定性を含む多くの未解決の問題を議論している。

【0014】上記したものに類似したシステムについて、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）とスチルビリジニウムまたはスチルバリウム塩から成る光感受性の合成ポリマーを使用して、酵素のグルコースオキシダーゼおよびウレアーゼを隣接するISFETゲート上に適用するための工夫がなされてきた（Takatsu, I. および Morizumi, T. in Sensors and Actuators 1987, 11, 309; Ichimura, K. 米国特許第4,272,620号明細書）。また、Morizumi, T. と Miyahara, Y. は、Sensors and Actuators

1985, 7, 1およびProceedings, Int'l. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators, 1985, 148 において、スピコンコーディングとマイクロシリンジを使用するマイクロプールへの注入を含む方法におけるこれらの光感受性 PVA膜の使用を記載している。スピコンコーディングされたフォトパターン化された PVA膜にて得られた ISFET 装置の長期間の安定性に乏しいことは、再度確認された。マイクロ注入された層の長期間の感受性は、一部は、これらの層のより大きな厚さと、その結果、ここに留まるより多数の酵素分子のゆえに、より大きくなる傾向がある。しかしながら、マイクロプールが形成され、そこに PVA混合物が注入されるためには、最初に、第2の光感受性の合成乾燥フィルムが ISFET 上にラミネートされ、照射され、かつ、現像されて、フレーム構造を与えなければならない。

【0015】診断テストを実施するための電気化学的装置上にウレアーゼを固定することを扱った他の参考文献が存在する。これらの方法の2, 3は、アゾドーフトリトグラフィック法を扱っており、これによれば、酵素はポリマー層の形成前またはその後組み込まれる(例えば、Morizumi, T. ら, in Sensors and Actuators 1986, 9, 373; Kimura, J. ら in Proceedings, Int'l. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators, 1985, 152; 日本特許第56-115950号および第62-263457号)。前記したこれらの方法は、依然として、有用なマイクロ加工法とは言えない。

【0016】日本の公報第62-235556号は3個のアンロードと共通のカソードを有する単一のセンサーを開示している。このセンサーは光一集積ポリマーとして、アゾ基を含有するPVAにて製造されている。固定されうると主張されている酵素には、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼおよびアルコールオキシダーゼが含まれる。固定基剤として、合成の光感受性ポリマー以外のいかなる材料をも使用することを示唆する記載は含まれていない。さらに、単一のウェハ上に何百もの同一の信頼しうるバイオセンサーを製造することに関する如何なる教示も明らかにない。

【0017】2.2.2. スクリーン印刷法
ケミカルセンサーを大量生産するための工程における一工程として、化学的に感受性の材料をスクリーン印刷することにおいては、或る種の有機結合剤中に含まれる沈澱した無機セラミック材料に主焦点が当てられてきた。例えば、Oyabu, T. らは、J. Appl. Phys. 1982, 53 (11), 7125 において、酸化スズペーストとスクリーン印刷法を使用する厚いフィルムガスセンサーの製造を記載している。この工程は、比較的これや液体膜電極または酵素をベースとするセンサーとは明らかに相入れない高温の焼成工程を含む。また、Cauhape, J.S. とその共同研究者は、Sensors and Actuators 1988, 15,

399, において、半導体酸化物のスクリーン印刷層の特性について、触媒結合剤の効果を議論している。Johnson, L.C. に付与された米国特許第4,216,245号明細書は、オフセットまたはシルクスクリーンドット印刷法を使用して、印刷された反応剤試験装置を製造するための方法を開示している。

【0018】2.2.3. インクジェット法
日本特許公開第62-23557号公報は集積されたISFET装置上に異なった酵素の層のアレイを製造するための方法を開示している。親水性の多孔フィルムが ISFET のゲート上に設けられ、次いで、フィルム上に酵素を配置するためにインクジェットノズルが使用される。この方法はスプレー式の方法を使用しており、最初に流体の滴が荷電され、次いで、ノズルから発射される。このシステムにおいては、ノズル、流体の滴および基質表面は決して物理的に接触していない。滴の直径は20から100ミクロンの範囲にある。また、日本特許公開第59-24244号公報はインクジェットノズル法に基づく同様の膜配置方法を開示している。

【0019】2.2.4. ミクロシリンジ法
前記に簡単に述べたように、Morizumi & Miyahara は ISFET 装置のゲート領域に合成ポリマー-酵素混合物を射出するためにマイクロシリンジ法を使用している。これらの前記した方法は当該領域内に施す液体を閉じ込めるための溝またはプールに依っている。Kimura と共同研究者の論文において(Proceedings, Int'l. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators, 1985, 152, 前記のとおり)、ISFET 装置が記載されており、ここでは種々の膜組成物はマイクロシリンジにより配置される。再度、ISFET装置のゲート領域近傍でその領域に線を引くためには厚フィルム抵抗ポリマーが用いられなければならない。この方法において、4つの種の膜が使用され、これらは互いに分離された。滴の容積のプロファイル(0.03 μm の滴容積が与えられるが)、その表面張力または装置の表面の自由エネルギーに対しては何も考慮されていない。少量の BSA を含む射出された酵素(例えば、ウレアーゼまたはグルコースオキシダーゼ)溶液が、引き続き適量の慣用のグルタルアルデヒド溶液を添加することによりゲート領域に固定されることに注目するのは興味がある。Knudson, M.B. らに付与された米国特許第4,549,951号明細書はイオン透過担体層の形および大きさの重要性を論じているが、これらのパラメータを制御するための洞察はなされていない。この参考文献は膜その領域に限定するために電極の周辺で曲がっている凹地の使用を教示している。いくつかのイオン感受性の膜の調製が記載されている。

【0020】Miyagi, H らは、Technology Research Report of the Institute of Electronics and Communication Engineers of Japan 1986, 85(304), 31 および 1985Pottsburgh Conference, 1058において、ISFET装

置に対して2つの膜を配置する方法;スクリーン印刷法とミクロシリンジ法を記載している。最初に粘度調節剤として微細なシリカ粉末の添加剤が用いられ、第二番目に“ミクロシリンジでフレーム内に注ぎ込まれた”型取り用の液体を膜中に保持するためにフレーム状の構造を必要としている。

【0021】やや関連する方法において、Bousse, L.J.らは、Proceedings of the Second Int'l Meeting on Chemical Sensors 1986, 499 にてラミネーション法を記載しており、これにおいてガラスのウエハは陰性の結合によりシリコンウエハに接合される。結合は、2個のウエハの間に室が形成され、その床部が電気化学的トランスデューサを保持するように実施される。次いで、室の天井を通して穴をあけるためにレーザーが使用される。液体膜の移植をつくり、一部脱気したベル型ジャーの中に薄片のウエハを置き、次いで、この装置を大気圧まで通気することにより、液体の膜材料をトランスデューサ上の室内に導入する(上記のようにすることにより、液体膜材料を脱気した室に押し込む)。

【0022】化学センサのアレイの一般的なマイクロ加工のための現行の技術は全く不十分であり、完全に満足である仕様を有する装置を提供することは、明らかであろう。さらに、現在の方法はISFET装置に適用するために主に開発された。残念ながら、ISFETおよびCHEM-FET装置は、常に、荷電された種のみを検知するという限界等の、固有に存在する欠陥に悩まされてきた(例えば、Flanagan, M.T.らの総説論文、Anal. Chim. Acta 1988, 213, 23を参照のこと)。小型化した電流装置の製造は、ほとんど確立されていない。膜材料をトランスデューサ上の室内に導入する(上記のようにすることにより、液体膜材料を脱気した室に押し込む)。

【0023】2.3. ケイ素反応剤および透過選択層
ケイ素カップリング剤、特に式 $R'Si(OR)_3$ 、式中、 R' は典型的には末端アミンを有する脂肪族基であり、 R は低級アルキル基である、を巨大分子を固体担体に共有的に結合させるために使用することは既知である。例えば、Weetall, H.H.による論文である Methods in Enzymology 1976, 44, 134-139 は、シランカップリング剤の固体担体の表面に存在する水酸基との結合の促進のために右カップリング剤を115°Cに加熱することを推奨している。化学的に修飾されたグラファイト電極が記載されており、ここでは、牛血清アルブミン(BSA)とグルコースオキシゲナーゼ(GOX)をグラファイトの表面に結合させ、かつ、交差結合(Co-Crosslink)させるために、段階的工工程においてアミノプロピルトリエタキシランおよびグルタルアルデヒドを使用した(Yao, T. Analytica Chim. Acta 1983, 148, 27-33)。これらの文獻は、シランカップリング剤がかぶせた材料の粘着を促進させる。または、共有的な固定剤として作用する以外の、他の機能のために使用することについて何も指示していない。

【0024】Fujiharaとその共同研究者は、J. Electroanalytical Chem. 1985, 195, 197-201において、過酸化水素の還元に対する触媒的な金電極表面の活性部位をブロックするための手段としてノードデシルトリエトキシシランのトルエン溶液を使用することを記載している。電極表面の高い酵素活性を維持する一方で、望ましくない電気的に活性な種を排除するために有効な厚さをもつ透過選択層を調製し、これを使用することは開示されていないし、また、示唆されてもいない。

【0025】2個の発行された日本の特許出願は非マイクロ加工の電極上に選択層を設けることについて言及している。日本の特許出願第62-261952号は、尿酸とアスコルビン酸の透過を排除し、過酸化水素の透過を可能とするシリコン層の形成のために、或る種のシラン化合物を使用することを記載している。日本の出願第63-101743号は、適当な化学剤の作用により架橋されたポリ(アリルアミン)の高ポリマーフィルムに由来する過酸化水素透過選択フィルムに関連する。上記の文獻のいずれもマイクロ加工された装置上に設けられたパターン化した透過選択シラン層を開示している。

【0026】2.4. フィルム形成ラテックス
ラテックス材料の粒子および明確な“フィルム形成”ラテックスは古くからの物質である。懸濁重合によりフィルム形成ラテックスを製造するための方法、その特性およびそれらの使用がレビューされた(例えば、Wagner and Fisher, Kolloid Z. 1936, 77, 12; Vanderhoff, J. W. and Hwa, J.C. Polymer Symposia Wiley-Interscience, New York (1969)を参照)。他の文獻には次のものがある:Whitley, G.S. and Katz, M.K. Indust. Eng. Chem. 1933, 25, 1204-1211 および1338-1348; Matsumoto, T. Emulsions and Emulsion Technology Vol.11, Lissant, K.J. (Ed.), Marcel Dekker, New York (1974) 第9章; Encyclopedia of Polymer Science and Technology Vol.5, John Wiley & Sons, New York (1966) p802-859; Dillon, R.E. Jr., J. Colloid Sci. 1951, 6, 108-117; および Sheetz, D.P.J. App. 1. Polym. Sci. 1965, 9, 3739-3773。

【0027】塩化カリウム参照溶液を含有するフィルム形成ラテックスのRELVAQUEがISFET装置のための参照マイクロ電極上で使用された(Sinsbaugh, S.L.ら、Proceedings, Symposium on Electrochemical Sensors for Biomedical Applications, Vol 86-14, Conan, K.N.L. (Ed), The Electrochemical Society, Pennington, NJ (1986), p66-73を参照)。この参考文献は、フィルム形成ラテックスは無機塩以外のいずれをも含有する媒質として使用することを教示または示唆していない。

【0028】要約すると、上記研究者による、信頼性のある大量生産したマイクロ加工装置において望ましいすべての特性と仕様を有する有効なバイオセンサを製造しようとする試みは、限定された成功しか示していない。

ウエハレベルの処理の一層重要な局面の1つは、複数の積層された構造体の水平および垂直方向の両方の大きさの制御であり、この大きさの制御はそれ自体センサーの作用の均一性に影響を与えるものであるが、これは、切断と包装がバイオ層の配置の前におこなわれるときは、変換しうる固定または支持層のもろさ、および、そこに含まれる生物活性の分子のこれややすい性質により、しばしばマニュアルによる操作にて行うことが必要とされる。従前の研究者はかかる方法に頼らなければならなかった。よりすぐれた材料を使用し、上記の敏感な生物活性分子をバイオセンサー、これは種々の診断上の応用に調整しうるものであるが、これに収容することを可能とする、フレキシブルなウエハレレベルの製造方法は、重要な意義を有するであろう。

【0029】2.5. イムノアッセイ法

イムノアッセイは種々の抗原または抗体およびその病気の関係または他の重要な生理学的状態をインビトロで検知するための敏感な診断上の手段である。イムノアッセイ手法の発展の初期の段階においては、固体に結合したポリクロナル抗体調製物は不均一なアッセイにおいて使用され、その場合、結合したラベル化抗原の程度を決定するために、または、液相中に存在する抗原の程度を決定するためにラベルした抗原の溶液を試料中の抗原と直接に競合可能とした。この方法は分析すべき試料中に抗原が存在することおよびその量を測定するための方法を提供した。

【0030】その後のイムノアッセイ法の発展により非競合的な免疫アッセイ法がもたらされ、そこでは固相に結合したポリクロナル抗体調製物も使用された。これらのアッセイでは、ターゲット抗原を含有する試料は固相と接触され、抗原/抗体の結合物が提供された。一定時間培養した後、試料を固相からとり出し、次いで、固相を洗って、すべての非結合抗原を除去した。その後、ラベルしたポリクロナル抗体を含有する溶液（例えば、放射性ヌクレオチド、酵素、またはケイ光基）を固相と接触させた。液相中の非結合ラベル化抗体を固相から分離し、そして、固相に結合したラベル化抗体（抗体：抗原：ラベル化抗体サンドイッチ）を測定し、試料中の抗原の存在および/または濃度を決定した。

【0031】より迅速なイムノアッセイ法も開発された。これらのアッセイにおいては、少なくとも2回の洗浄工程の1つを省略でき、そして、平衡に到達するまでに必要な培養時間は短縮しうる。

【0032】従来の前記した方法において、結合した抗体は一般にはビーズまたは小さな粒子に結合している。抗体は表面上にコーティングもできる。アッセイ中、培養時間は一般に固相およびラベルした抗体の両方のために必要である。結果を素早く入手したい場合には、長時間の培養時間は特に問題である。加えて、長時間の培養時間と複数回の洗浄は、アッセイを実施するために高度

に訓練された人材と複雑な機器を有する医療実験室にのみアッセイの利用を有意に限定することとなった。

【0033】その結果、現在のところ、より簡単で、より迅速なイムノアッセイのプロトコル、および数疾患、医師の室およびさらには家庭でのヘルスケアサービスにおいて使用するためのより簡単な装置が必要となっている。

【0034】2.6. 比色アッセイ

ELISA および酵素アッセイを含む、最も多く存在しているアッセイプロトコルは、比色検出を提供する。一般にこれらの方法はそれ自体が発色団となる、または、発色団を生成する基質を使用しており、この発色団が分光測光法により検知される。しかしながら、分光測光法による検出には欠点がある、というのは、測定には極めて長時間必要であり、また、試料混合物が腐るからである。また、いくつかの発色団は極めて不安定であるから、非発色団の種に関連するアッセイ方法が有用である。

【0035】インドキシルおよびその誘導体のいくつかは分光測光的アッセイにおける基質として使用されてきた。S. Cotson と S.J. Holt (Proc. Roy. Soc. B 1958, 148, 506) はアルカリホスファターゼ活性を確認するために組織の染色を行う際これらを使用することを研究した。P.L. Ely と L.K. Ashman は、イムノプロットにてアルカリ性ホスファターゼ抗体抗イムノグロブリン中のタンパク混合物に対するモノクローム抗体の特異性を決定するための基質としてプロモクロロインドキシルホスフェートの使用を研究した (Methods. Enzymol. 1986, 121, 497)。J.J. Leary, D.C. Brigat と D.C. Ward はニトロセルロース上に固定されたDNAまたはRNAにハイブリッド形成したビオチンでラベル化したDNAプローブ、即ちビニオプローブを可視化するためにプロモクロロインドキシルホスフェートを使用した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80(13), 4045)。S.J. Holt と P.W. Sadler は、インドキシルまたは置換したインドキシルの相応するインジゴイド染料への転換を、細胞内酸素の局在化のための細胞化学染色法に応用することを記載した (Proc. Roy. Soc. B 1958, 148, 481)。

【0036】インドキシルおよびこれのハロゲン誘導体の空気酸化の動力学は、S. Cotson と S.J. Holt により、彼らの酵素に関する研究のための組織化学的染色の一部として研究された (同上, 1958, 148, 506)。彼らの観察は、一般に受け入れられている見解、即ち、遊離基を含め、これらの酸化反応は必ず有機過酸化物質または過酸化水素を生成するという見解 (Wateis, W.A., The Chemistry of Free Radicals, Oxford University Press, (1946)) と一致した。

【0037】インドキシルの空気酸化は分光測光法を使用して研究された。上記の参考文献はすべてインドキシ

ルに由来するインジゴイド化合物の発色性を利用した。インドキシル化合物のインジゴイド染料への酸化的変換という発色性を利用する例には次のものが含まれる: デイスク電気泳動におけるアルカリおよび酸ホスファターゼ組織化学的検証のためのインジゴゲンニック反応 (E. Epstein, P. L. Wolf, J. P. Horwitz および B. Zak, *Am. J. Clin. Pathol.* 1967, 48(5), 530); ポリアクリルアミドディスクゲル中のアルカリ性ホスファターゼに対する同時アノ染料カップリング法とインジゴゲンニック反応の比較 (T. F. Savage, E. C. Smith および Collins, *Stain. Technol.* 1972, 47(2), 77); タンパクプロテインの原則と応用 (J. M. Gerstl および G. E. Palade, *Anal. Biochem.* 1983, 131(1), 1); ニトロセルロースシートに伝達されたタンパクを染色するための敏感な方法 (Z. Wojtkowiak, R. C. Briggs, L. S. Hnilica, 同上, 1983, 129(2), 486); ウェスタンブロットにおける抗原性タンパクの可視化 (D. A. Knecht, R. L. Dinond, *Anal. Biochem.* 1984, 136(1), 180); ウェスタンブロットにおけるアルカリ性ホスファターゼ共役抗体の検出のための迅速かつ敏感な方法 (M. S. Blake, K. H. Johnston, G. J. Russell-Jones, および E. C. Gotschlich, 同上, 1984, 136(1), 175); 免疫濃度-固相イムノアッセイのための新しいフォーマット (G. E. Valkirs および R. B. Arton, *Clin. Chem.* 1985, 31(9), 1427); タンパク混合物に対するモノクローナル抗体の特異性を決定するためのイムノブロットに関するアルカリ性ホスファターゼ共役抗-イムノグロブリンの使用 (P. L. Ey および Le onie K. Ashman, *Methods. Enzymol.* 1986, 121, 497); および ELISA-スポットアッセイの感受性を改善することが見いだされた、レドックスのカップリングと酵素反応を含む研究 (C. Franci と J. Vidal, *J. Immunol. Meth. ods.* 1988, 107(2), 239)。

【0038】再度述べると、前述の参考文献はすべて、例外なく、発色性の基質としてのプロモクロロインドキシルホスフェートのスペクトル特性に依存している。

【0039】2.7. 電気化学的センサーおよびアッセイ最近では、イムノアッセイプロトコルに統合可能な電気化学的センサー、いわゆるイムノセンサーの製造に強い関心がある。M. J. Green はアッセイ生成物を電流により、または、電位的に検出するために電気的に活性なラベルを統合する幾つかのイムノアッセイをレビューした (Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1987, 316(1176), 135)。しかしながら、A. P. F. Turner, I. Karube および G. S. Wilson により編集された本である Biosensors: Fundamentals and Application, Oxford University Press, 1987, 中に報告されている実験室のプロトタイプを一般の商業的に利用する論文に翻訳することは、相応の製造プロトコルが存在しないことにより妨害された。

【0040】色による検出の代替としての電気化学的検出の特定の例は Anal. Chem. 1984, 56, 2355 に記載されている。この文献は、酵素ラベルが電気的に不活性な化合物を検出可能な電気的に活性な化合物に変換するアッセイを開示している。電気的に活性な化合物であるフェノールは、+750mV の電位で酸化される。しかしながら、この方法は一般的に使用しうるものではない、なぜならば、他の電気的に活性な成分が血液または血清中に存在し、これらもこの電位で酸化されるからである。

【0041】“免疫電気化学的検出”の当業者に深く広まった圧倒的な考えを表わす極めて最新の参考文献は Rosen, I. および Rishpon, J. による J. Electroanal. Chem. 1989, 258, 27, である。この論文において、酵素は電気的に活性でない基質を活性なものに変えることができるラベルとして使用される。特に、アルカリ性ホスファターゼが使用された酵素である。フェニルホスフェート、p-ニトロフェニルホスフェートおよびp-アミノフェニルホスフェートを含む幾つかの基質が試験された。記載された電気化学的検出法において、酵素により触媒される加水分解反応から生成するアルコール生成物 (即ち、それぞれフェノール、p-ニトロフェノール、およびp-アミノフェノールである) が検出される。変換された基質を除いて、他の電気的に活性な種を検出する可能性は示唆されておらず、また、実際に、検討もされていない。

【0042】また、ヨーロッパ特許出願第247796号と第270206号は、イムノアッセイを実施するための方法を記載しており、これは主に免疫活性の分子が結合した移動可能な磁気粒子を含む。H₂O₂ のような電気的に活性な種を生成する酵素共役体が記載されている。しかしながら、検出の基本的手段は、化学ルミネッセンスに関連し、すべての場合においてインドキシル化合物は普及されておらず、イムノアッセイを実施する際に有用なマイクロ加工検知装置は開示されていない。

【0043】【課題を解決するための手段】本発明は完全マイクロ加工バイオセンサーおよびその大量生産のための種々の方法に関する。このマイクロ加工方法は、平面ウェハ上に複数の薄フィルムおよびそれに関連する構造を、具体的な再現性がありかつ重ね合わされた構造の大きさの特徴を制御しうる態様で確立した。本発明において、上記再現性と大きさの制御は化学センサーの大量生産のためのウェハレベルにおいて実現され、このセンサーは生物学的に活性な巨大分子および選択された分析物の分子をより容易に検知しうる種に変換するのに必要な他の反応剤を組み込むものである。

【0044】本発明は、また、新規な電気化学的アッセイ方法および対象となる生物種 (分析物) の存在および/または濃度を決定するのに有用な新規な完全マイクロ加工バイオセンサに関する。本発明は、また、検知しう

る電気化学的酸化または還元を起こさないが、電気的に活性の種の濃度に変化を生ずる基質変換体と反応を起こす基質（以下“基質”という）の新規な使用に關する。これらの変化は測定され、また、対象となる分析体の濃度に比例して關係する。加えて、発明はバイオセンサを製造するための方法に關係する。

【0045】本発明のバイオセンサとバイオセンサは、特に、イムノアッセイを実施する際に有用なものとして表わされる。このイムノアッセイは基質変換体が基質を加水分解する酵素であるものとして示される。この加水分解された基質は、次いで、本発明のバイオセンサ、リガンド/リガンド受容体に基づく（LLR-ベースの）バイオセンサにより電気化学的に検知される電気化学的な種（ジオキゲンおよび過酸化水素）の濃度に変化を生ずる反応を起こすことができる。サンドイッチおよび競合アッセイは、この発明の方法とLLR-ベースのバイオセンサを使用して実施することができる。これらのアッセイにおいて、本発明のバイオセンサの1つの態様は触媒電極（catalytic）と適宜の参照電極（ベースセンサ）、バイオセンサ上に設置された粘着プロモータ層、およびこの粘着プロモータ層の上に固定された生物活性層。この生物活性層は対象となる免疫学的な分析体の受容体（第1メンバー）であるものから成る。

【0046】本発明の完全マイクロ加工バイオセンサは、適当なベースセンサから成る第1の構造体が設けられた実質的に平面のウェハから成る。次いで、得られたベースセンサ上に付加的な構造体が設けられ、この付加的な構造体は、対象となる、より小さな検知可能な化学種の運搬を可能とする一方で、干渉する化学種に対してはバリヤーとして作用しうる半透性の固体フィルムまたは透過選択性の層を含むものである。これらの検知しうる化学種は典型的には電気的に活性な分子であり、そして、低分子量のイオン性の種を含むことができる。半透性の固体フィルムは、さらに、予め選択されたイオン性の種（例えば、アンモニウムイオン）に対してベースセンサを感受性にさせるために作用しうる化合物または分子を含む。さらに、上記の透過選択層は、粘着プロモータとしても機能しうるものであり、これにより、予め選択されたリガンド受容体は本発明の完全マイクロ加工LLR-ベースのバイオセンサの例に固定されうる。

【0047】最も注目するものに値するのは、本発明で記載された支持マトリックス（support matrices）であり、この基質は与えられた分析試料中の特定の分析体を検知可能なおよび/または定量的に測定可能な種に変換するための原則的な手段を構成する種々の生物活性な分子を支持するのに必要な物理的および化学的特徴をするものである。生物層が大きさの特徴を最適に制御し、かつ、広範囲の生物活性分子を収容するものに融通性があることを可能とする、完全マイクロ加工バイオセンサの特定

の所望の領域に上記の基材を局在させ、または、パターン化するための手法が開示される。

【0048】加えて、本発明は、また、試料中に高濃度で存在する選択された分析体の種の運搬を減らすための重ねておかれた構造体として、本発明のバイオセンサの特定の態様において作用する材料を開示する。この分析体減少層（AA）は、AA層が存在しない場合に観察されるであろうものよりも、より広範囲の分析体の濃度において線形のセンサの応答を可能とする。さらに、重ねられたAA層、これは好適にはシロキサン/非シロキサン共重合体から成るものであるが、これは、試料の極めて大きな分子または他の汚染成分であって、これがその下部に存在する構造と直接に接触するとバイオセンサの信頼性に干渉するか、汚れとその結果起こる減少をもたらすであろうものを排除することができる。

【0049】もし、AA層が相応の構造および組成物から成るものである場合には、これは気体の透過性膜としても機能しうる。本発明の特定の態様において、このような気体透過性膜は大変小さな分子のみを通過せうという実用上の利点を有する。気体透過性膜もバイオセンサの電極部分のすぐまわりを外部の液体の乱流から防護する。こうして、好ましいLLR-ベースのセンサにより実施される測定は、流れ依存性から解放される。

【0050】本発明のAA層は、基質ウェハまたは本発明の全体のマイクロ加工プロセスの他の工程およびバイオセンサの自動化された、ウェハレベルの大量生産という概念に合致する。大きな上り、局在化の、かつ幾何的な制御を有する、いかなる干渉構造体の上においても設けられる。

【0051】上記のAA層とは全く別に、分子量感受性の透過性フィルムとして機能することができる半透性固体フィルムは、本発明の方法により設けられ得る層の中に含まれる。透過選択層ともいわれるこの半透性の固体フィルムの組成と最終の厚さに依存して、或る閾値以上の分子量を有する分子をこのフィルムに投入し、かつ、拡散することから排除することができる。この透過選択層の機能と有用性の一般的な例示として、約120またはそれ以上の分子量を有する分子は約5から約10nmの厚さをもつ固体フィルムにより有効に阻止される。排除される分子の大きさに対する制御の程度と、固体フィルムを通して拡散しうる、より小さな分子の運搬の速度を変更することは、約2から約50nmの範囲の厚さを有する固体フィルムにより達成され得る。或る種の材料に関して、これらの透過選択層は1nmほどの厚さでありうる。また、100nmの厚さになり得る。

【0052】このフィルムは、基質ウェハまたはいずれかの平面状の分析体-感受性装置上に多くの方法により設け得るが、最も好適には、ウェハを横断してスピニングコーティングされる。適当な溶媒と混合されたシリカ化合物から成る、当初の液体フィルムとして設け得る。こ

のシラン化合物は式R'nSi(OR)_{3-n}を有するものであり、式中、nは0, 1, 2の整数であり、R'は炭素数が3~12個の炭化水素基であり、Rは水素または炭素数が1~4個の低級アルキル基である。好ましくは、この薄膜は、もし存在するならば、シラン化合物のアルコキシ基を加水分解するのに十分な量の水分を含有する。液体フィルムを有するウェハは、次いで、固体フィルムを形成するのに有効な時間だけ、約90~250℃の温度に加熱される。典型的には、この温度において約5~30分の加熱が必要とされる。当初のシラン溶液の非揮発性含量は制御することのできる透過選択層の最終の厚さを決定する。

【0053】所望ならば、この透過選択層はフォトリソグラフィ処理技術手段により装置の特定の予め選択された領域に形成しうる。「リフトオフ(lift off)」のような方法およびプラズマエッチングまたは、その代わりのウェットエッチング工程と組み合わせたフォトリソグラフィの使用は、透過選択性固体フィルムの位置と配置を定義するのに用いることができる。本発明における利用が開示されている他の液体混合物の大多数と同様に、当初の液体シラン混合物は、検知装置の複数の予め選択された領域でマイクロ施しうる。流体媒質のかかるマイクロ施しは、基質ウェハを保持する真空チャックの制御された移動により調節されるコンピュータ制御シリンジにより、自動的にかつ一様な予め決定された量で実施し得る。このマイクロ施し法はマイクロ加工方法と合致し、以下において、一層詳細に議論される。

【0054】こうして、電流による電気化学的検知装置において、所望の閾値以上の(例えば、120以上)の分子量を有する干渉する電気活性の種は、本発明の透過選択性のシラン層を用いることにより、触媒的電荷表面と相互作用すること効果を排除しうる。かかる透過選択層は、しかしながら、ジョキゲンや過酸化水素の自由より低い分子量の電気活性な種が、下部に存在する電極表面と還元反応を起こすことを可能とする。

【0055】電位バイオセンサーにおいて、イオン透過性化合物をさらに組み込むのに資する官能基と化学的特性をもつ重合性材料は、上記の検知装置の指示電極上に設けられる半透過性のイオン感受性フィルムとして使用しうる。電極-フィルム界面における電位の形成は、平衡に達した。いくつかの予め選択されたイオン種の電荷密度に依存する。このイオン種の同定は半透過性フィルム中に組み込まれたイオン透過性担体の選択により決定される。次に、ここで記載された新規な生物層中に固定された酵素は、分析試料中に存在する特定の分析体の種を予め選択されたイオン性の種に転換するのを触媒する。

【0056】上述の透過選択層は、ここで生物層として言及されるものの上にかぶされる構造体の中で起こる化学工程によって生成される。イオン性の電気活性な化学的な種に対する特異性により選択される。選択された分

析体の種または外因性の反応剤をイオン性の電気活性な化学的な種に転換する化学工程は、生物層に組み込まれた酵素のような、少なくとも1つの生物的に活性な分子によって実施される。生物層の支持マトリックスと本発明の方法は、その後の処理、貯蔵、操作または分析体ないしは反応剤組成物により引き起こされる変成から、生物活性な分子を安定化することを助ける。これらの支持マトリックスは、対象となる分析体がマトリックスを通して自由に拡散し、化学的変成を起しうるように、或る程度の多孔性を保持しなければならない。本発明の完全マイクロ加工バイオセンサーは本質的に乾燥して貯蔵される傾向にあるから、この多孔性はバイオセンサー実際の分析方法のために製造するのに使用される目録の定め工程や当初の湿潤化においても役立つ。もし生物活性な分子の感受性がこのように指令されると、支持マトリックスは、マトリックスが局所的に設けられ、および/またはフォトリソグラフィ的にパターン化され、そして現像された後で、例えば、溶液から導入される酵素を受け入れ、そして固定することもできる。とにかく、その後の処理または操作による不活性化、または、貯蔵時の単なる時間の経過による不活性化を克服するために、生物層中には十分な生物触媒および/またはリガンド受容体が存在しなければならない。十分な生物触媒/リガンド受容体は、拡散する分析体の分子を十分かつ容易に転換するために好適な状態を提供するために固定されるべきである。こうして、本発明の生物層は分析体の種と選択的に相互作用し得る十分な生物活性分子と支持マトリックス、このマトリックス中に生物活性な分子が組み込まれ、このマトリックスはフォト形成可能なタンパク性混合物、フィルム形成ラテックス、またはこれらの材料の組み合わせたものである、から成る。すでに述べたように、分析体の種は支持マトリックスを通して自由に透過し、かつ、そこに含まれている生物活性分子と相互作用しうるものでなければならない。上記で示した種々の添加物が、本発明の目的と矛盾しない所望の機能的および構造的特性を達成するために、支持マトリックス中に添加し得る。

【0057】前に述べたとおり、この生物層はウェハレベルの製造方法に特徴的な大きなおよび幾何的制御をもって形成される。薄フィルム手法、スピンコーティング、フォトリソグラフィ材料の使用、マスキング、放射エネルギーへの露出、および現像方法は、大多数の生物学的に活性な分子のために使用できる。前記した方法によって、支持マトリックスとしてはフォト形成可能なタンパク性混合物が最も便利に使用される。しかしながら、もし必要ならば、極めて弱い酵素は、光増強された(photoenhanced)構造体を設けた後で導入してもよい。かかる支持マトリックスは、また、電解質層ならびに対象となるリガンド受容体が固定しうるフォトリソ層として役立つ。好ましくは、免疫活性な種またはリガンド

受容体は、光明化された構造体が形成された後に、導入される。

【0058】代わりに、特に、マイクロ施与が生物層を形成するために選ばれた方法である場合には、合成並びに天然由来の重合性物質を含めフィルム・形成組成物が、固体マトリックスを設けるために使用でき、光形成可能なゼラチンと光形成ラテックスの組み合わせも使用しうる。再び、反応剤または添加剤が特定の応用または分析により指令されるように、これらの層状の構造体中に取り入れうる。

【0059】このように、本発明は実質的に平面状の表面上に施与された層を形成するための方法にも関する。移動可能なマイクロシリンジ装置を提供し、この装置を施与される量の液体上に密接にコントロールするような態様で使用して、表面張力と粘度特性が最適になる迄、施与される液体の組成物を調節することによって、この方法が予見可能で再現可能な大きさを有する層を提供することに成功した。さらに、ここに開示されたマイクロ施与方法は、与えられた表面の自由エネルギーを変更するための既知の方法と効果的に結合でき、その結果、設けられた層の物理的特性（例えば、接触角度、厚さ、容積または領域）は所望の応用を受け入れられるように、さらに調整しうる。

【0060】付加的な層は、既述したとおり、装置の感受性および応答時間を高め、線形の応答範囲を拡大し、そして、積み重ねられた構造体の耐久性を増大させるのに望ましい。分析体減少層の場合には、シリコキサンと非シリコキサン単位から成る特定の共重合体も有利に使用しうる。これらの材料も約5から約500nmの厚さで、積み重ねられ、または設けることができ、そして、光リトグラフ方法で局在化しうる。典型的には、分析体減少層は約120またはそれ以上の分子量を有する分析体の種がそこを通じて運搬されるのを減ずるのに十分な厚さを有すべきである。前に述べたとおり、これらのAA層は気体が透過性膜を提供するのに十分な厚さで設けることもできる。フォト形成工程に関連して、例えば、非バリアである（即ち、関連する分析体の種の運搬に支障とならず、またはこれを排除しない）フォト形成可能な混合物を使用することにより、“レジストキャップ (resist cap)” 法を用いる。

【0061】本発明のこれらの、および、付加的な目的はここに含める開示および実施例から明らかである。

【0062】

【発明の実施の形態】付属した図面の説明を行うことにより、この発明はより良く理解しうる。これらの図面、特に完全マイクロ加工センサ構造の図面は、それ自体、質的かつ相対的であり、種々の層またはバイオセンサーの一部の間の完全な大きさ上の関係を示すことを意図するものではない。

【0063】第1図は、6×3mmの長方形シリコンチップ

上の差動電流グルコースセンサーの上部正面図である。異なった層の意味は、以下のセクション5.1において議論される。同様の一般的配置は本発明のLLRベースのバイオセンサーの態様に対しても使用しうる。代わりに、第1図は、また、6×3mmの長方形のチップ上の差動電流LLRベースバイオセンサーを示す。チップの種々の領域/層は、接触パッド(1)、信号ライン(2)、皮膜保護(3)、銀/塩化銀参照電極(4)、金属触媒的指示電極(5)、粘着プロモータ(6)、または局在した粘着プロモータ(7)、結合手段(8)、およびリガンド受容体層(9)に関する。

【0064】第2図 開いている銀/塩化銀参照電極を有する第1図のグルコースセンサー対の1つの横正面図。

【0065】第3図 電位血液尿素窒素(BUN)センサーと参照電極の横正面図。

【0066】第4図 1個のチップ上の異なるバイオセンサーのアレイを示す第3図のセンサーの上部正面図。

【0067】第5図 HEPES緩衝液試料中の20mMグルコース(C)またはHEPES緩衝液のみ(X)を使用する電極電位(mV)の関数としての、本発明のグルコースセンサー(過酸化水素の酸化/還元)の電流出力(namps)にて。

【0068】第6図 試料中のグルコース濃度(mM)の関数としての本発明のグルコースセンサーの電流出力(namps)にて。

【0069】第7A図 気体透過層を使用する本発明の電流酸素センサーの他の態様。この配置も本発明のLLRベースバイオセンサーの使用に対して良く適合する。LLRベースの態様において、電解質層(12)は第一のフォトリジスト層である；気体透過性膜(8') (AAまたは気体透過性としても置及される)は第一のフォトリジスト層上に設けられる；そして、フォトリジストキャップ(9、第2フォトリジスト層)はAA層上に存在する。

【0070】第7B図 図は下部に存在する電解質層(またはLLRベースのバイオセンサーの態様における第1フォトリジスト層)を実質的に囲む気体透過性中の配置を示す。

【0071】第8A図 ここで記載したジョキシングセンサーに基づくグルコースバイオセンサーの他の配置。

【0072】第8B図 固定されたリガンド受容体または免疫活性な種(45)を有するリガンド/リガンド受容体に基づく(LLRベース)バイオセンサー。下部にあるセンサーの配置は第7B図のものに由来する。この図は、活性な種(45)を固定するための結合手段(40)を使用する。

【0073】第9図 本発明の方法により完全マイクロ加工された、3個の血液尿素窒素(BUN)センサーの、2から20mMの水溶性試料のアンモニウムイオン濃度の変化に

対する応答の均一性。

【0074】第10図 1から10mMの水溶液の尿素濃度の変化に対する本発明のBUNセンサーの応答。

【0075】第11図 尿素の添加による本発明のBUNセンサーの応答。

【0076】第12図 本発明の自動マイクロ施与システムの1つの可能な配置の図であり、ここでシリンジ(5)は施与される物質を保持しており、これは方向 z の位置を制御するための手段(8)に結合しており、一方、ウェハ(2)は真空チャック(1)に保持され、これらのすべての方向への移動は、同様に、自動化され、コンピュータ化された手段により制御される。このシステムはまた、配列を視覚化する手段を含む(例えば、ウェハ上の相応の配列特徴により配列されるラチクル(ratcler)を備えたビデオカメラ)。

【0077】第13図 複数のシリンジ保持器(7)をもつ自動マイクロ施与システムの他の配置。シリンジは開口(13)に挿入され、そして、真空チャックとウェハは環(11)の下部に、大きな開口(12)を通して配置される。

【0078】第14図 本発明を使用して実施される典型的なサンドイッチアクセスの図式的な描写が示される。固定されたリガンド受容体(第1メンバー)はバイオセンサーの表面近くに置かれ、分析物の分子(リガンド)に出会う。リガンドは受容体に結合し、次いで、抗体-酵素共役体(ラベルした抗体または第2メンバー)により結合される。次に、基質が加えられ、これは酵素(ラベルまたは基質転換体)により仲介される化学的変換を起す。生成した中間体は、ジオキシゲンの消費と過酸化水素(O_2 と H_2O_2 のいずれも検知可能な、電気活性な種である)および最終生成物(最初の基質がインドキシル誘導体であるときは、インジゴ)の生成を含む、段階状の反応を引き起こす。

【0079】第15a-15e図は、表面の自由エネルギーの特性を変更するために、電極表面を予め処理した効果を示す。マイクロ施与流体の接触角度 θ と、それによる、電極上の膜層の厚さが制御される。

【0080】第16a-16c図は、大きな接触角度をもつもの(第16a図)、小さな接触角度をもつもの(第16b図)、および、引き続いてフォトリソニング工程に施されたもの(第16c図)を含むマイクロ施与生物層の種々の態様を示す。

【0081】本製造方法は、予測可能な一様な応答特性を有するバイオセンサーの大量生産に関するものである。そのバイオセンサーは選択された分析対象種の便利な実時間の検出および定量測定のために臨床上セッティングするの有益である。一体化された生化学検出装置は、強じんであり、そして調節された多孔度を有する不連続の層状構造を確立することによりトランスジューサー・アレイの上に形成され、その層状構造の少なくとも一

つは一種以上の生物活性種を固定化し得る。生物活性分子という用語は、イオン、イオン交換樹脂、酵素、抗体、抗原、レクチン、神経化学セプター、オリゴ核酸、オリゴ糖、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、DNAの分子、RNAの分子、タンパク質、糖タンパク質、メタプロテイン、コファクター、免疫グロブリン、およびこれらの混合物または活性フラグメントまたはサブユニットを含む生理学的に重要なその他の巨大分子を包含するに使用される。また、生物膜という用語は特に酵素、酵素複合体またはこれらの混合物を表すのに使用し得る。一般に、広範な類のリガンドレセプターが本発明のバイオセンサー中に固定化され使用し得る。

【0082】本発明の方法を構成する工程、並びに本発明の微小製作された装置の不連続の層状構造を確立するのに使用し得る開示された材料は、広範囲の分析対象種が選択的に調査し得るような驚くべき程度の融通性および可能性を保持する。更に、微小製作された検出装置、即ち簡単に言えばバイオセンサーは、全血、リンパ液、血漿、血清、唾液、尿、大腸、汗、粘液、涙、髄液、鼻分泌液、頸部または腫の分泌液、精液、胸膜液、羊水、腹水、中耳液、関節液、胃吸引液等の如き生体液を含む殆どの液体試料の分析に利用できる。また、固体試料または乾燥試料は、分析に連した液体混合物を与えるのに適した溶媒に溶解し得ることが理解されるべきである。

【0083】本発明の第二の開示部分は、活性層の上に任意の別の層を光限定して(photodefine)活性層を分析対象(即ち、分析または測定すべき種)を含む分析試料または分析溶液の有害な成分と接触することから防ぐ手段である。或る場合には、このような追加の層は、特に選択された分析対象が試料中に高温で存在する場合に、生物活性層への選択された分析対象の輸送を減少するのに利用できる。そうすることで、バイオセンサーが線形応答を有する分析対象濃度の有効範囲が更に高い値に拡大される。また、このような分析対象減少(AA)層は得られた検出装置の応答性を損なうことがあり、それ故、それらの厚さは慎重に考慮し、そして調節する必要がある。試料中の選択された分析対象の濃度が非線形のセンサー応答を生じる程大くない場合には、このようなAA層は確立される必要がない。

【0084】本発明の或る実施態様に於いて、このAA層または遮光性層は、或種の分析対象または電気活性種の輸送を減少することの他にまた、試料の乱れまたは流れの効果に対してセンサーの応答を“絶縁する”という役割を果たす。外部の試料の流れに対して感受性が少ないセンサー応答を有することは更に再現性のある信頼し得る信号を与え、このような形状は本明細書に更に記載されるLLR-系バイオセンサー実施態様に特に好ましい。

【0085】更にまた、半透過性の固体フィルムが発見され、この固体フィルムは薬品検出装置の予め選択された領域の上に確立されパターン化(光限定)し得る。こ

の選択透過層 (permselective layer) は、所望の電気活性種が前記のフィルム中を自由に拡散し得る間に、電気活性種を妨害する侵入に対するバリアーとして作用し得る。本発明の特別な実施態様に於いて、選択透過層はシラン化剤から誘導される。典型的には、比較的安定なシラン前駆体が、シラン前駆体の中央のケイ素原子に結合された少なくとも二つの基を加水分解し得る溶液に溶解または混合される。次に、得られた試薬溶液はウェーハを横切ってフィルムとして確立され、またはウェーハもしくはベース・センサーの予め選択された領域の上に局在化される。次に、半透過性層または選択透過層が慎重に制御された加熱条件下で得られる。層の選択透過性は層の厚さに一部支配され、その厚さは、順に、使用されるシラン化剤の性質および量、並びにフィルムを確立するのに使用される方法に依存する。所望により、シラン化剤の混合物が使用されてもよい。

【0086】殆どの妨害電気活性種を排除することにより、層少ない修正測定器が必要とされ、その結果が検出上一層簡単な装置である。更に、ベース・トランスデューサ (これは、しばしば触媒金表面を含む)、前記の選択透過層の存在下で約150℃を越えて約250℃までの温度に加熱し得る。この計画的な加熱工程は、ベース・センサーの増強された溶解性を関係する一次電気活性種 (例えば、過酸化水素またはジオキシジェン) に与えると共に、一層高い分子量の妨害電気活性種 (例えば、尿酸またはアスコルビン酸) に対する固体フィルムの排除性を維持する。

【0087】本発明の特別な実施態様に於いて、分析対象濃度から処理可能な信号への変換は電気化学的手段による。これらのトランスデューサは、電流測定、電圧測定または伝導率測定 (conductimetric) のベース・センサーを含んでもよい。しかしながら、本発明の最小製作技術および材料は、実質的に平面の媒に製作されるその他の型のトランスデューサ (例えば、音波検出装置、サミスタ、ガス検出電極、電解効果トランジスタ、光学ガイドおよび誘電界波ガイド (evanescent field wave guide) 等) に明らかに適用し得る。パイオセンサーに利用し得るトランスデューサ、並びにそれぞれの型のトランスデューサまたはパイオセンサーが利用し得る分析対象の種類は有益な説明および表示が、*Trends in Bioelectrochem.* 1984, 2(3), 59-65のChristopher R. Loweの論文に見られる。このLoweの論文に含まれる開示および説明が参考として本明細書に含まれる。先に記載された三つの電気分析技術のうち、電圧測定技術および電流測定技術が好ましい。何となれば、その出力信号が特別な分析対象に対するベース・センサーの応答に最も容易に直接に開示し得るからである。

【0088】電圧測定および電流測定の型のパイオセンサーの製造に関する特別な例が、本開示の実施例の項目に見られる。

【0089】本希望生物試料の分析に使用するためのパイオセンサーのレイの実施できる製造法を合わせて生じる本発明の種々の特徴が本明細書に説明される。電流測定グルコースセンサーおよび電圧測定尿酸センサーの好ましい実施態様が更に記載される。これらのセンサーは、所定の試料 (例えば、静脈血液) 中に存在するグルコースおよび尿酸のそれぞれの濃度を分析するのに有益である。種々のその他のセンサーが同様に開示され、これらは本発明の発見により可能にされた改良形状の説明と共に生理學上重要な分析対象分子の検出および測定のための免疫分析またはアフィニティ分析を行なうのに特に適した実施態様を含む。

【0090】更に詳細には、本発明はまた新規な電気化学的測定操作および関係する選択された生物 (分析対象) 種の存在および/または濃度を測定するの有益な新規な全体に微小製作されたLLR-系パイオセンサーに関する。本発明のこの特徴は、非電気活性基質 (以下、“基質” と称する) が水性ベースの系で接近しやすい操作電圧の電極で検出し得る電気化学的な酸化または還元を受けなが、基質コンパータと反応して不安定な中間体を生成するという発見に属する。中間体は迅速な自己酸化を受けて、電気化学的に検出可能な種の濃度の変化を生じる。これらの検出可能な種はジオキシジェンおよび過酸化水素を含む。その変化が測定され、関係する分析対象の濃度に関係する。

【0091】このような新規な測定装置およびLLR系パイオセンサーは、潜在的に妨害する物質の存在下で、特別な濃度の混合物中の一種以上の分析対象の存在を検出し、またはその量を監視するのに有益である。前記の如く、特別な分析対象の存在または不在が、分析対象と第一メンバ (検出レセプター) との間の特異的な結合相互作用の程度から測定される。結合相互作用それ自体は、ラベル (基質コンパータ) と接合される第二メンバ (検出レセプター) が基質と反応して検出可能な種 (例えば、過酸化水素またはジオキシジェン) の生成および/または消費 (濃度の変化) を生じる場合に検出される (第14図を参照のこと)。これらの濃度変化は、本発明の装置および測定操作を使用して電気化学的に検出される。本発明の特別な実施態様に於いて、ラベルされた分析対象種はまた“融合測定”操作に使用し得る。

【0092】本発明の好ましい実施態様に於いて、複合酵素が基質コンパータ (ラベル) として使用されて電気活性種の濃度の変化に影響する。酵素は分析対象に接合されてもよい。あらゆる変化が電気化学的に検出され、そして関係する分析対象に関係する。特に、本発明は、ラベルとして酵素アルカリホスファターゼの好ましい使用および基質としてインドキシルホスフェート誘導体の好ましい使用に関する。しかしながら、本発明がそのように限定されないことは、当業者に明らかである。一般的な場合には、生成物が迅速な自己酸化を受けない限

り、エステルゼまたはヒドロラーゼがインドキシルエステルを加水分解するの体使用し得る。更に別の場合には、酵素と基質それ自体との反応が電気活性種の濃度のこのような変化を生じる。

【0093】更に詳細には、排他的ではなく、本発明は関係する分析対象を測定するための電気化学的免疫測定操作および装置に関する。これに関して、酵素ラベルされた抗体または酵素ラベルされた抗原は基質と反応して、電気化学的検出を受けやすい電気活性種の濃度の変化に影響する。加えて、酵素ラベルされた抗体または酵素ラベルされた抗原はそれぞれ生体試料中の相補性の抗原または抗体種に結合されるので、それ故、電気化学的に検出される酵素反応は関係する種の定性測定または定量測定を与える。

【0094】詳しくは、本発明は、非電気活性のインドキシルリン酸エステル（これは基質である）と、アルカリホスファターゼでラベルされたヤギ抗ヒト免疫グロブリンG（抗体）またはアルカリホスファターゼでラベルされたテオフィリン（抗原）との反応に関する。これらの二つの反応はそれぞれサンドイッチ型または競合型の免疫測定法に関連する。

【0095】本明細書に例示された発明はまたその他の測定系に及ぶことが注目されるべきである。理論的には、少なくとも一つのメンバーが本バイオセンサーに固定化し得るあらゆるリガンド／リガンドレセプター対が測定操作に組み込むことができる。表I（項目5.2.2）は、このようなリガンドレセプター／リガンド対の二、三の例を列記する。更に、ラベルとの反応、またはその後の自己酸化がジオキシジェンまたは過酸化水素を生成し、そして／または消費するその他の基質は、容易に意図される。それ故、本発明は、前記のように、ラベルとしてのホスファターゼ酵素の使用に限定されない。何となれば、試薬と反応して電気活性種の濃度の変化をもたらす他のヒドロラーゼおよびラベル酵素が同様に好適であるからである（例えば、表Iを参照のこと）。本発明は免疫測定操作および免疫測定装置に関して記載されるが、その他の相補性結合種（例えば、酵素／代謝産物、レクチン／多糖、および核酸オリゴマー／筑オリゴマー）の間の結合反応のようなその他の型の特異的な結合反応がまた上記の電気化学的測定操作および装置を使用して検出されることがまた提示されることが再度強調する必要がある（例えば、表Iおよび表IIを参照のこと）。

【0096】それ故、本発明は、電気化学センサーを利用し、そして長すぎるインキュベーション工程を必要としない、分析対象レセプター測定、例えば免疫測定およびイムノメトリックアクセスを簡単且つ迅速に行なうための方法および装置を提供する。ホスファターゼ（ラベル）活性の検出のための本明細書に記載された電気化学操作および装置はまた高度に特異的であり、そして比

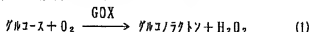
較的感度が良い。加えて、色素産生の妨害および濃度測定の妨害が検出系の性質により排除される。非電気活性の酵素基質と一緒に測定中の酵素ラベルの使用はまた、通常、妨害物質を除去するための試料の前処理を必要としないで、従来行なわれた結合測定よりも大きなレベルの分割まで既知の特異的な結合測定の拡大を潜在的に容易にする。更に詳しくは、上記の濃度範囲のナノモルの分析対象の測定がそれにより達成される。

【0097】5.1. 電流測定グルコースセンサー本発明の全体として微小製作されたグルコースセンサーは、電流測定電気化学トランスデューサー、即ちベース・センサーを構成する薄膜構造が確立されるシリコン基質を含む。本発明の特長な実施態様に於いて、続いてオーバーレイされる構造は、(i) ベース・センサーの少なくとも一部に重ねられた半透過性の固体フィルムまたは選択透過層（その膜はベース・センサーの上に積層される接着を促進し、そして最も重要なことには、静脈血液またはその他の生体液試料中に通常存在する妨害電気活性種がベース・センサーの触媒電気活性表面に達することを防止することである）；(ii) 選択透過層の少なくとも一部に重ねられたバリエーション（その中に充分量の生物活性分子、この場合には酵素グルコースオキシダーゼが組み込まれている）；および(iii) 試料から生物層への分析対象、この場合にはグルコースの輸送を減少する役割を果たす層として記載することができる。こうして、分析対象減少(AA)層は、試料中のグルコースの容積濃度の所定の率まで酵素に達するグルコースの量を制限する。

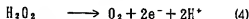
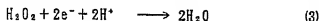
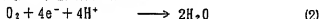
【0098】本明細書に使用される“組み込まれた”という用語は、組み込まれた材料が固体相または支持マトリックスの外表面置またはその中に保持されるあらゆる状態または条件を記載することを意味する。こうして、“組み込まれた”材料は、例えば、固定され、物理的に閉じ込められ、マトリックスの官能基に共有結合され、あるいはその多孔質表面に吸着されてもよい。更に、前記の材料の“組み込み”を促進するあらゆる方法、試薬、添加剤または分子リカー剤は、これらの追加の工程または薬剤が本発明の目的に有害でないがその目的に合致する場合に、使用し得る。この定義は、勿論、生物活性分子が“組み込まれる”本発明の実施態様のいずれにも当てはまる。

【0099】その続いてオーバーレイされた構造はベース・センサーの指示電極の電気活性表面の場所に制限されることが好ましい。これらの構造は微分配技術または写真平版技術により局在化し得る。フォトリソグラフィを含む追加の層が、光形成工程の結果としてAA層の上に任意に存在してもよい。この最も外部のキャップは、それが、たとえあったとしても、関係するあらゆる種に対してバリエーションとして作用せず、それ故、除去される必要がないように確立し得る。

【0100】本装置の分析値が前提とされる基本の化学変換および電気化学変換は、酵素グルコースオキシダーゼ(GOX)の作用によるグルコースからグルコンラクトン



【0102】式1により示されるように、この変換はジオキシジェンから過酸化水素への同時還元により行なわれる。ジオキシジェンおよび過酸化水素の両方は、ペーシング・トランスデューサの指示電極の電気触媒表面でレドックス反応を行ない得る電気活性種である。その他の電気活性種(例えば、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 NH_4^+ 等)はレドックス反応そのものを行なわないが、電極界面で電位の変



【0104】これらの反応の全てが電気活性種の消費および測定可能な正または負の電流の生成を生じる。上記の三つの反応のうち、式4が本発明の実施態様に好ましい。何となれば、それは電流測定測定される過酸化水素1当量当たり1当量のジオキシジェンを放出するからである。生成されたジオキシジェンは式1の酵素プロセスに利用できるジオキシジェンの充分な供給を維持することを助ける。過酸化水素の酸化に必要とされる電位は、銀/塩化銀基準電極に対して約+300〜約+600mV、好ましくは+350mVである。

【0105】本発明のグルコースセンサーの指示電極電位の関数として、生じた電流がHEPES緩衝液(x)およびHEPES (Sigma Chemical Company) 緩衝液(o)中の20mMのグルコース溶液を含む試験試料に関して第5図に示されている。指示電極電位がこの特別なグルコースセンサーに関して約150mVから約350mVへ増加されるにつれて、電流の増加が観察される。指示電極電位の更なる増加は、定常状態で、生じた電流の大きさがAA層中の

$$i = nFAD \frac{\sigma [P]}{\sigma x} \quad (5)$$

$$x = 0$$

【0108】(式5)中、nは電極で基本電気化学反応に関与した電子の数であり、Fはファラディ定数であり、Aは電極の面積であり、そしてD_Pは電気活性種、Pは拡散係数である)

定常状態では、バイオ層中の酵素反応の速度はAA層中のグルコース分析対象の供給速度に等しい。分析対象(AS)に関するAA層の透過度(Q_{AS})は、センサーがミカエリス・メンテン定数、K_mにより測定されるような、

への変換を含む。

【0101】

【化1】

化を促進する(例えば、項目5.3の電位差測定装置を参照のこと)。こうして、適当な電位を指示電極表面を横切って基準電極に対して適用することにより、下記の電気化学反応の一つが起こり得る。

【0103】

【化2】

送されるグルコース分析対象の量により最終的に制限されることを示す近似レベルの応答を生じる。逆に、電子が過酸化水素から水への還元(式3)に使用されるにつれて、更に負の指示電極電位でもって負の電流が観察される。もう一度、電流に関する制限定常状態の負の値が或る負の電位(約-100mV)で到達され、そして指示電極電位の負の値の更なる増加中に比較的に一定に留まる。基準電極に対する指示電極電位の小さな変化により生じた電流の大きな増分変化を避けるためには、指示電極をプラトード操作することが好ましい。

【0106】先の電気化学反応の結果として生じた電流は、最終的には、試料中に存在するグルコースの濃度に関係し得る。電流測定センサー、例えばグルコースセンサーの場合には、測定変数は拡散のフィックの法則と組合せたファラディの法則により電極表面(x=0の距離)の電気活性種のフラックスに関係する(式5)。

【0107】

【数1】

酵素の活性と共に、線形応答を有する分析対象濃度の上限を支配する。酵素の量およびその活性が十分に高い限定された場合には、電流は次式(式6)のように分析対象に関する腸過度(Q_{AS})および分析対象の容積密度(AS)₀のみにより制御し得る。

【0109】

【数2】

$$i = nFQ_A[AS],$$

(6)

【0110】(式中、 i 、 n 、および F は上記と同じ意味を有する)

実際には、定常状態の電流応答は酵素層中の酵素活性の量と独立である。このような状態は操作安定性を促し、そして得られるバイオセンサーの有効な貯蔵寿命を延長する。

【0111】5.1.1. 電流測定ベース・センサー

本発明の特別な実施態様である電流測定ベース・センサーは、金属物質のプラズマ蒸着と組合せて写真平版により実質的に平面のシリコン支持体の上に製作される。ベース・センサーは、同じ形状寸法および面積の二つの触媒電極を含むユニットセルを含んでもよい。この形状は示差型の測定を可能にする。何となれば、活性酵素を有するバイオ層がこれらの触媒電極の一つのみに確立されるからである。順に、このような示差測定は、特に、妨害種が選択透過膜により容易に排除し得ない状態で、装置がバックグラウンドレベルより上の選択された生物活性分子の活性により電流を測定することを可能に得る。

【0112】添付図面を参照して、第1図は、単一のシリコンウェハー上で幾何アレイが数百回反復されている好ましい電流測定グルコースセンサーを示す。それぞれの触媒指示電極、5 (この場合にはイリジウム金属が使用される)は、組合せ基準、対向電極、4 (特に、銀-塩化銀)により囲まれている。これらの電極は過不動態化 (over-passivated) 信号回路、2により三つの接触パッド、1の一つにそれぞれ接続される。これらの接触パッドは、バイオセンサーを外部の制御エレクトロニクスに接続する手段として利用できる。3により示された渡線が付された領域は不動態化層を表す。選択透過 (シラン) 層 (接着プロモーターおよび半透過性固体フィルムとして作用する)、6は全構造の上に存在してもよく、または、好ましくはユニットセルの電極部分に局在化されてもよい。続いてオーバーレイされた構造: バイオ層または酵素層、7; AA層、8; および最も外側の層、9、フォトリソグラフィがイリジウム触媒の上にあり。

【0113】第2図は、好ましい示差グルコースセンサー・ユニットセルの指示電極および基準電極部分の対の一つの層状構造を示す。指示電極の対のその他のメンバーはバイオ層、7中に活性酵素を含まない。支持体ウェハー、20はこの場合にはシリコンであり、ジオキシゲン化ケイ素の非導電性層、15がその上に存在している。また、パターン化チタン金属渡線、10は信号回路を第1図の接触パッドに伝えるものとして利用できる。イリジウム電気触媒層は指示電極構造中に5で示され、一方、銀および塩化銀は基準電極構造中にそれぞれ4および4'で示される。ポリイミド不動態化層は3であり、そして

選択透過 (シラン) 層 (および接着プロモーター) は6である。最後に、8は分析対象減少 (AA) 層 (また、しばしば、この開示のどこかで気体透過性膜と称される) であり、そして9はフォトリソグラフィで形成される。

【0114】電気触媒はこの特別な実施態様ではイリジウムであるが、指示電極の触媒金属は後期遷移貴金属のいずれかによりつくられてもよい。それ故、金、白金、銀、ロジウム、イリジウム、ルテチウム、パラジウム、またはオスミウムの如きその他の金属がまた好適である。炭素または水銀の如きその他の元素がまた有益である。電位差測定型の電気化学センサーを伴う別の実施態様では、イリジウムタンタル酸化物の如き混合金属酸化物化合物金がまた金属表面として使用し得る。更に別の可能な実施態様では、ジオキシゲンセンサーは金指示電極を含むことが好ましい。これらの金属のうち、銀、金、または白金が基準電極金属として好ましい。その後塩素化される銀電極が基準電極として最も好ましい。

【0115】これらの金属は、上記のプラズマ蒸着法を含む、当業界で既知のあらゆる手段により、またはエレクトロレス (electroless) 法 (この方法は、支持体が金属塩および還元剤を含む溶液に浸漬される場合に、前もって金属化された領域への金属の蒸着を伴わない) により蒸着し得る。そのエレクトロレス法は、還元剤が導電性表面での金属塩の同時還元と共に導電性の (金属化された) 表面に電子を供与することによって進行する。その結果物は吸着金属の層である (エレクトロレス法の追加の説明に関して、Wise, E.M. Palladium: Recovery, Properties, and Uses, Academic Press, New York, New York (1988); Wong, K. R., Plating and Surface Finishing 1988, 75, 70-76; Matsukawa, M. R., Ibid. 1988, 75, 102-106; および Pearlstein, F., "Electroless Plating," Modern Electroplating, Lowenheim, F.A., Ed., Wiley, New York, New York (1974), Chapter 31を参照のこと)。しかしながら、触媒金属電極表面に高密度の活性部位を与えるためには、このような金属蒸着法は金属接着および最小の表面汚染に関して良好な金属を有する構造を生じる必要がある。このような高密度の活性部位は、過酸化水素またはジオキシゲンの如き電気活性種の有効なレドックス変換に必要な性質である。粉れもなく、金属層を確立する均等方法が当業者に明らかである。

【0116】加えて、実質的に平面状の支持体はシリコンウェハーであることを必要としないが、研削アルミナウェハー、ガラスシート、制御された細孔のガラス、または平面化プラスチック溶媒ポリマーであり得る。実際に、平面状の支持体は一種以上の種々の元素を含むあらゆる材料から誘導されてもよく、これらの元素は炭素、窒素、酸素、ケイ素、アルミニウム、銅、ガリウム、ヒ

素、ランタン、ネオジウム、ストロンチウム、チタン、イットリウム、またはこれらの組合せを含むが、これらに限定されない。

【0117】また、支持体は、化学蒸着、物理蒸着、またはスピンドル被覆を含む当業界で公知の種々の方法によりスピニングガラス、カルコゲニド、グラファイト、ジオキシジェン化ケイ素、有機合成ポリマー、等の如き材料で固体担体の上で被覆されてもよい。超伝導材料の確立が望ましいと見なされる場合には、追加的支持体は、ヒ化リウム、ランタンガレート、ネオジウムガレート、または、それ程望ましくないがチタン酸ストロンチウムを含んでもよい。

【0118】微小製作の初期工程の一つに於いて、良好な金属支持体接着は、チタン金属のプラズマ蒸着の前に支持体ウェーハをアルゴンプラズマ中でエッチングすることにより促進し得る。チタン層は信号回路用の導電性材料として利用でき、また支持体表面へのその後の金属層の接着を促進する。チタンは約2nm/秒の速度で約20～約500nm、好ましくは約80nmの厚さまで蒸着される。この工程に続いて、イリジウムが約0.5nm/秒の速度で約10～約100nm、好ましくは約20nmの厚さまでプラズマ蒸着される。痕跡量のジオキシジェンでさえもが酸化イリジウムの生成をもたらし、金属蒸着中にジオキシジェンを排除することが重要である。過剰量の酸化物は、実質的に増大されたキャパシタンス、ひいては一層遅い応答を有する劣ったセンサー表面を与える。

【0119】粘着性残渣の一般に薄い層は金属表面の活性を著しく低下し得ることが観察された。これに關して、微小製作されなかった表面は不活性な研磨材、例えば約0.3μmの粒径のアルミナ粉末のスラリーの助けにより電極を研磨することによりしばしば再活性化し得る (Sawyer, D.T. および Roberts, J.L. *Experimental Electrochemistry for Chemists*, Wiley, N.Y. (1974), p.78を参照のこと) が、この処理は微小製作された電極アレイに不適合であることを注目することが重要である。それ故、グルコースセンサーの製作に好ましい方法に於いて、ポリイミド不動態化層 (第1図および第2図中の3) は触媒電極金属の蒸着の前に加工されることが必須である。加工の順序を逆にすることは触媒金属表面の汚染をもたらし得る。

【0120】それにもかかわらず、本発明の目的には、信号回路の不動態化は任意の工程であることがまた発見された。少ない微細構造を有する (即ち、隆起部の少ない層平らな) 装置を得、そして最大の程度の制御をもってウェーハスピニングにより材料層の適用を容易にする装置を得るためには、ポリイミドまたはその他の不動態化層を全く使用しないことが望ましくさえある場合がある。この省略は、信号回路を構成する金属としてのチタンが電気活性層 (例えば、過酸化水素、アスコルビン酸、尿酸) のレドックス変換に不十分な電気触媒で

あるという観察からおそらく可能である。

【0121】5.1.2. 接着プロモーターおよび半透過性の固体フィルム

この型の平面状トランスデューサに多層を蒸着する場合に考慮されるべき微小製作の別の特徴は、成分層の間の接着を促進する「複雑な (detailed)」荒い微細構成の欠如である。しばしば、特別な材料が、下にある表面に対する接着を促進するのに使用される。この目的に普通使用されるカップリング試薬はアーマミノプロピトリメトキシシランである。そのシラン化合物は適当な溶媒と混合されて液体混合物を生成する。次に、液体混合物は幾つかの方法によりウェーハまたは平面状機出装置の上に適用または確立できる。これらの方法は、スピンドル被覆、浸漬被覆、噴霧被覆および微小分配 (microdispensing) を含むが、これらに限定されない。微小分配法は、材料のマイクロスボットが装置の多数の予め選択された領域で分配される自動化法として行ない得る (下記の項目5.4を更に参照のこと)。加えて、「リフトオフ」の如き写真平版技術またはフォトリソグラフィを使用する写真平版技術が得られる選択透過フィルムの形状寸法を局在下し限定するのに使用し得る (下記の項目6.1.2を参照のこと)。

【0122】シラン混合物を生成するのに使用するのに適した溶媒は、水性溶媒および水混和性有機溶媒、並びにこれらの混合物を含む。アルコール性の水混和性有機溶媒およびこれらの水性混合物が特に有益である。これらの溶媒混合物は、約200～6,000の分子量を有するポリエチレングリコール (PEG) の如きノニオン性表面活性剤を更に含んでもよい。混合物1dl当たり約0.005～約0.2gの濃度の液体混合物へのこれらの表面活性剤の添加は、得られる薄いフィルムを平面化することを助ける。また、シラン試薬の適用前のウェーハ表面のプラズマ処理は、更に平面状の確立された層を促す改良表面を与えて得る。

【0123】また、水不混和性有機溶媒がシラン化合物の溶液を調製するのに使用し得る。これらの有機溶媒の例は、ジフェニルエーテル、ベンゼン、トルエン、塩化メチレン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、テトラクロロエタン、クロロベンゼン、ジクロロベンゼン、または、これらの混合物を含むが、これらに限定されない。

【0124】プロトン性溶媒またはその混合物が使用される場合、水が最終的にアルコキシ基の加水分解を生じ、有機ケイ素酸化物 (特にn=1の場合) を生成し、これが縮合してポリ (オルガノシロキサン) を生成する。また、これらの加水分解されたシラン試料は、支持体表面上に存在し得る極性基、例えばヒドロキシルと縮合し得る。非プロトン性溶媒が使用される場合、大気水分がシラン試薬に最初存在するアルコキシ基を加水分解するのに充分であり得る。

【0125】シラン化合物 ($n=1$ または 2 の場合) の R' 基は、その後適用される追加の層と機能上適合するように選ばれ、R' 基は、通常、支持体表面への辞素の共有結合に有益な末端アミン基を含む (例えばグルタルアルデヒドの如き化合物が Murakami, T. *ら*, *Analytical Letters* 1986, 19, 1973-86; および前記の Yao, T. の文献に記載されるような連鎖剤) として使用し得る。

【0126】本発明に於いて、式: $R'Si(OR)_4-n$ (式中、 $n=0, 1$, または 2) を有するシラン化合物のフィルム (これは充分な期間、通常 $5 \sim 15$ 分間少なくとも約 100°C に加熱された) は、ジオキシシランおよび過酸化水素の輸送により電流に著しく影響することなく、電気放電への妨害電気活性種、中でもアスコルビン酸および尿酸の輸送を著しく減少し得ることが発明された。本発明の好ましい実施態様に於いて、シランの R' フラグメントは $3 \sim 12$ 個の炭素原子を含む炭化水素基であり、そして R は $1 \sim 4$ 個の炭素原子の低級アルキル基である。加えて、炭化水素フラグメントは酸素、窒素、リン、または硫黄の如き少なくとも一つのヘテロ原子を更に含んでもよい。更に、イソシアネート、シアネート、ホスフェート、等の如き、これらのヘテロ原子の安定な組合せを代表する官能基が存在してもよい。或る場合には、炭化水素フラグメント R' が好ましくは炭化水素フラグメントの末端で好適な脱離基を更に含む有機シラン試薬を使用することが、望ましくさへあり得る。このようなシラン試薬の一つの例は γ -クロロプロピルトリメトキシシランである。この様に、求核性部分が潜在的な脱離基の置換によりシラン層に共有結合し得る。

【0127】低級アルキル基、R はメチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル、ターシャリブチル基またはこれらの混合物である。ルーチン実験が、どの基が使用される特別な製造条件に最も良く適するかを決める。揮発性、沸点および粘度特性のような因子が重要な考慮事項であり得る。また、アルコキシ基が加水分解される容易さは絶対的ではない (dispositive) ことがある。また、 $-OR$ 基は水性環境下で実質的に加水分解されるので、R がまた水素基であるシラン試薬は本発明の範囲内にある。

【0128】実際に、本発明の重要な特徴は、或る種のシラン試薬が便利な媒体中に配合され、実質的に平面状の表面に確立され、続いて制御条件下で処理されて選択透過性を有する層または被覆物を与え得るという発見および認識である。これらの観察の前に、シラン試薬は一方では単なる接着プロモーターとして使用され、また他方では不透過性のガラスを確立するために使用されたことが指摘されるべきである。

【0129】それ故、新しく調製されたケイ素酸化物のアルコール性溶液はウェーハの上にスピンされ、そして加熱を伴う脱水反応が半透過性を有する材料を生じると中間の程度まで加熱し得る。シラン試薬の $-OR$

基は加水分解され (そして後で脱水され) ることが好ましいが、このような加水分解は必ずしも必要ではないことが指摘されるべきである。テトラアルコキシシランからジオキシシラン化ケイ素の中間体形態への熱変換は、エーテル化合物の発生により伴われる。

【0130】四置換シロキサンアルコキシシランまたはヒドロキシシランの一つまたは二つを、ケイ素に直接結合された炭化水素部分のような容易に加水分解されない基で置換することは、得られるシラン層を、それらの「ガラス質の」相当品よりも「更に多孔質に」する。こうして、所定の厚さに関して、式 $Si(OR)_4$ のシランから誘導された層は式 $R'Si(OR)_3$ の試薬から得られた層よりも透過性ではない。後者の増大された透過性は、おそらく、酸素橋かけられたケイ素原子の網状構造を確立する $R'Si(OR)_3$ の劣った能力により最も良く説明される。

【0131】次に、最高の性能に関して、シラン層の厚さおよび組成は調節される必要がある。このような調節は、使用されるシラン試薬の同定を注意して選択し、溶媒混合物中のその濃度を調節し、そしてシランの溶液がスピン被覆によりウェーハに付着される場合には適切な回転速度を決めることにより達成される。 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 N - (2-アミノエチル) - γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 N - (2-アミノエチル) - γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、 10 -アミノデシルトリメトキシシラン、 11 -アミノウンデシルトリメトキシシラン、 2 - [p - (N - (2-アミノエチル) アミノメチル) フェニル] エチルトリメトキシシラン、 n -プロピルトリメトキシシラン、フェニルトリメトキシシラン、ジエチルホスフェートエチルトリエトキシシラン、または N - N -ビス (2-ヒドロキシエチル) アミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -クロロプロピルトリエトキシシランの如き、多数のシラン化合物が市販されており、そしてこの様に処理されて、その他の材料のその後の層の接着を促進し、しかも小分子選択膜として作用し得る半透過性の固体フィルムを生じ得る。先に述べたように、プレセレクトまたは誘電層の前駆体として使用されるその他の材料がまた適当な条件下で使用し得る。Emul-silone Company (Whippany, New Jersey 07981) から入手し得るシリカフィルムが利用し得る。その他のシランの例は、テトラヒドロキシシロトリシケート (ケイ酸) またはテトラメチル、テトラエチル、テトラプロピル、テトラブチルシロトリシケートの如きテトラアルキルシロトリシケートまたはこれらの混合物を含む。しかしながら、好ましいシラン化合物は N - (2-アミノエチル) - γ -アミノプロピルトリメトキシシランである。得られるセンサーは、製造し易く、過酸化水素濃度の変化に対して非常に早い応答時間を有し、そして妨害電気活性種から生じる信号を実質

的に含まない。

【0132】前記の如く、選択透過シラン膜の透過度はシラン試薬の性質によるだけではなく、その厚さに大きく依存する。厚さの有効な範囲は約1~約100nm、好ましくは約2~約20nmの範囲にある。しかしながら、約50以下の分子量を有する分子の有効な拡散を可能にすると共に、約120以上の分子量を有する分子を排除することが所望される場合には、シラン層の好ましい厚さは、特に好ましいシラン化合物が使用される時には、約5~約10nmの範囲であるべきである。金属触媒表面と相互作用することから排除することが所望される妨害電気活性種の型は、尿酸、アスコルビン酸、サリチル酸、2-(p-イソブチルフェニル)プロピオン酸、システイン、4-アセトアミドフェノール(アセトアミノフェン)、還元グルタチオン、等(それらの薬剤または代謝産物の他にそれらの生理塩を含む)を含むが、これらに限定されない。

【0133】シラン化合物を有する平面状ウェハを約150℃~約250℃の範囲の温度に加熱することは、その後の過酸化水素の酸化に対する指示電極応答を最大にすることが更に発見された。これらの高温では、電気触媒の表面が更に高度に活性化されることが可能である。

【0134】それとは別に、実際の試料が導入される前に適用電位を正から負の値にサイクルすることがまた有利である。グルコースの知覚電流測定センサーに関して、測定される電流信号がバックグラウンドノイズに較べて小さいことがある。この状態は、膜層の不完全なぬれまたは電極表面の失活により生じ得る。この信号対ノイズの比は、測定する前に電位パルスを電極に適用することにより増加し得ることがわかった。このような操作は、外部エレクトロニクスにより行なわれる適当なプログラミングされた順序により自動的に都合よく行うことができる。

【0135】本グルコースセンサーの特別な実施態様によれば、次に、イリジウム電気触媒が銀-塩化銀基準電極に対して+350mVの電位で被毒され、選択透過(シラン)層が使用電極上に局在化される。しかしながら、項目5.1.6で注目されるように、本グルコースセンサーの一つの形状が製造でき、この場合、選択透過(シラン)層が気体透過性の層(これはシロキサン-非シロキサンポリマーを含むことが好ましい)により置換し得る。後に説明されるように、このような材料は充分な厚さで確立でき、そしてセンサー、チップ、またはウェハの予め選択された領域の上に局在化し得る。更に、異なる型の選択透過層が検出装置の異なる予め選択された領域で使用し得る。多量のフォトリソ層の間に介在された気体透過性の層を含むこのような実施態様は、更に後記されるLLR系バイオセンサーに特に適する。

【0136】5.1.3. オーバーレイされたバイオ層
電流測定グルコースセンサーに関して、生物活性分子が

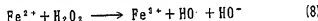
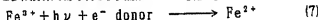
固定化される担体マトリックスは、生物触媒に安定化環境を与えることの他に光形成性(photoformable)であることが好ましい。このような光形成性マトリックスはネガティブフォトリソのように挙動することが最も好ましく(これらの方法はポジティブリソに適合できるが)、その結果、不連続構造が適用されるトランスデューサー・アレイの前もって決められた領域の上に形成し得る。パイオ層は通常イリジウム触媒層と配列される。それ故、担体マトリックス材料は、まずスピンドルによりウェハ上に適当な溶液中の液体溶液として適用される。担体マトリックス材料は、この段階で約0.02μm~約20μm、好ましくは0.1~2.0μmの厚さであり得る。また、その層はその他の方法で適用されてもよく、これらの方法は浸漬被覆、噴霧被覆、または自動微小分配を含むが、これらに限定されない。マトリックスフィルムの付着の後に、放射線感受性材料がウェハ上にマトリックスの露出領域を固定するのに必要な変換を開始するのに充分な時間においてバクーニングマスクを通して照射エネルギー(例えば、可視光、紫外線、赤外線、X線、電子線、イオンビーム、等)に露出される(ネガティブフォトリソの場合)。平版印刷操作の現像段階は、通常、照射ウェハを別の化学試薬または溶媒に暴露することを伴い、これが最終的に未露出マトリックス材料の除去をもたらす。一方、露出領域はウェハに定義されたまま残る。

【0137】充分な量の光増感剤(光活性剤または光開始剤)を含むが広範囲の生物活性分子が固定され、または組み込まれる水和タンパク標物質が好適なネガティブフォトリソ材料として挙動し得ることが驚くことに発見された。また、これらの水系の光形成性多成分ネガティブリソ材料が得られるレジストの特性および性質を改善する種々のその他の成分(しばしば非タンパク標成分と称される)を含み得ることがわかった。

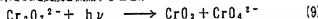
【0138】レジスト混合物のタンパク標物質は架橋性マトリックスとして作用し、そして光活性剤は照射エネルギーへの露出後に架橋反応を開始するのに利用できる。本明細書に使用されるように、タンパク標物質は、実際の物質が天然タンパク質、失活タンパク質、変性タンパク質、加水分解種、またはこれらの誘導体化生成物であろうとも、一般にタンパク質から誘導される物質を含むことを意味する。好適なタンパク標物質は、アルブミン、カゼイン、γ-グロブリン、コラーゲンおよびコラーゲン誘導生成物(例えば、魚ゼラチン、魚グルー、動物ゼラチン、および動物グルー)を含むが、これらに限定されない。本発明の光形成性タンパク標混合物は実質的にタンパク質誘導物質を含むことを注目することが重要である。光開始された架橋反応により生じた固定化マトリックスとして利用できるのはタンパク標物質そのものである。このマトリックスは、生物活性分子に非常に良い環境をまた与える光安定性膜として作用する

のに特に適する。

【0139】好ましい物質は、ノーザン冷水魚 (Northern cold water fish) から誘導された魚ゼラチン (または "テレオステアン・ゼラチン (Teleostean Gelatin)" (Sigma Chemical Co., セントルイス, MO) として知られる) である。多成分光増感剤材料は、0.01~50g/dl、好ましくは0.5~10g/dlの魚ゼラチン固形分を含んでもよい。広範囲の高酸化状態の遷移金属化合物 (塩、錯体、またはキレート) が好適な光増感剤として利用できる。代表的な化合物は、塩化第二鉄、クエン酸アンモニウム鉄 (III)、クエン酸カリウム鉄 (III)、シュウ酸アンモニウム鉄 (III)、シュウ酸ナトリウム鉄 (III)、シュウ酸カリウム鉄 (III)、シュウ酸第二鉄、酒石酸アンモニウム鉄 (III)、酒石酸マンガ、重クロム酸カリウム、および重クロム酸アンモニウムを含むが、これらに限定されない。最も好ましい物質はクエン酸アンモニウム鉄 (III) および重クロム酸アンモニウムであり、これらはその材料中に約0.1~10g/dl、好ましくは約1~2g/dlで存在し得る。また、光活性剤それ自体は光増感性色素および、好ましくは高酸化状態の、遷移金属化合物を含む多成分系であり得る。実際に



【0142】再度、理論により制限されることを望まないうが、クロム系はタンパク質物質の溶解性の変化を生じるのにわずかに異なって作用すると考えられる。重クロム酸塩の暴露は、式9に示された変換を開始することが



【0144】次に、重クロム酸イオンはゼラチンの官能基と化合してその溶解度特性を変え得る。いずれにしても、クロム系の現像媒体は水のみを含み得る。

【0145】追加の化合物がレジスト材料に添加されてもよく、その特性および性質を改善し得る。N,N'-メチレンビスアクリルアミドの如き架橋剤がパターン性を促進するのに使用し得る。その他の添加剤が表1に列記される。好ましい架橋剤はN,N'-メチレンビスアクリルアミドであり、これは約0.01~約10g/dl、好ましくは約1~2g/dlの濃度範囲であり得る。表1に列記された例は、排他的ではなく、そして本発明の範囲を限定することを意味しない。更に、多くのその他の型の架橋剤は、二つの官能基がその化合物中に存在する限り使用し得る。好ましい官能基はビニル基である。しかしながら、存在し得るその他の基は、ホルミル、カルボキシ、酸無水物、アミン、アミド、エポキシ、ヒドロキシ、シオノ、イソシアネート、チオ、ハロ、またはこれ

は、得られる光活性化色素が好適な遷移金属化合物を還元し得る限り、あらゆる光増感性色素が使用できる。光増感性色素は、フルオロセレン (またはそのハロゲン化誘導体)、エリオシン、ローダミン、またはメチレンブルー、等の如きキサンチン系色素であってもよい。金属成分は Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ti^{4+} 、 Cu^{2+} 、 CrO_4^{2-} 、 Ag^+ 、および MoO_4^{2-} の塩を含むが、これらに限定されない。この場合、適当な対イオンは金属塩に溶解性を与えるように選ばれることが好ましい。別の例に於いて、Oster, G.K. および Oster, G.J. *Am. Chem. Soc.* 1959, 81, 5543-5545を参照のこと。

【0140】機構は完全には理解されないが、紫外線の如き輻射エネルギーはクエン酸イオンの如き適当な電子供与体の存在下で常磁性鉄 (III) イオンから第一鉄状態への還元を開始する (式7) が考えられる。現像液中の過酸化水素への鉄 (II) イオンの暴露後に、ヒドロキシルラジカルが生成され (式8)、これが順に、特にポリ不飽和化合物の如き添加架橋剤の存在下で、タンパク質物質の架橋を促進する。

【0141】

【43】

推測し得る。

【0143】

【44】

らの安定なあらゆる組合せを含むが、これらに限定されない。

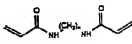
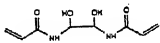
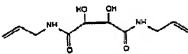
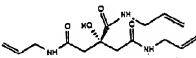
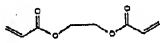
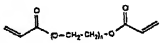
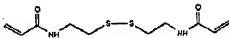
【0146】グリセロールの如きポリヒドロキシル化合物、並びにソルビトール、エリスリトール、およびマニトールの如きアルコール糖が、架橋マトリックスに添加されてもよく、更に開放した (多孔質の) 構造の形成を促進し得る。このような多孔性改質物質はまた簡単な塩を含んでもよく、ポリヒドロキシル化合物と組合せて使用し得る。また、洗剤が添加されてもよく、ウェーハ上へのスピンドレ中のマトリックスの平面化を促進し得る。ポリエチレングリコール、トリトンX-100、または還元トリトン-100の如きノニオン性表面活性剤物質が約0.01~約1g/dl、好ましくは約0.1g/dl濃度で使用し得る。

【0147】

【表1】

表 1 (1)

その他の好適な架橋剤

化合物	分子量	構造式
N, N'-メチレンビスアクリルアミド (n-2)	168	
ジヒドロキシエチレンビスアクリルアミド	204	
ジアリルタータルアミド	232	
トリアリルツトリアクトリド	312	
エチレンジアクリレート	170	
n-ボリエチレングリコールジアクリレート (n-2)	214	
ビスアクリルタリジン	262	

【0148】

【表2】

表 I (2)

その他の好適な架橋剤

化合物	分子量	構造式
7セトビスアクリルアミド	198	
1,1-ジメチルエチレンビスアクリルアミド	196	
2,2-ジメチルプロピレンビスアクリルアミド	210	
ジアクリルジペラジン	196	
ジアクリルエチレンジペラジン	306	
1,6-ヘプタジエン-4-オール	112	
アクリルアミド	71	

【0149】

【表3】

表 I (3)
その他の好適な架橋剤

化合物	分子量	構造式
アクリル酸	72	
塩化アクリロイル	90	
アクリルアルデヒド	56	
アクリロニトリル	53	
アクリロイルジメチルアセタール	102	

【0150】生物活性成分、またはそれを含む混合物は、ネガティブフォトレジスト（例えば、魚ゼラチン／クエン酸アンモニウム鉄（III））と予備混合され、それと同時に付着されてもよく、あるいはその後パターン化担体マトリックス中に含浸されてもよい。同一センサーのいずれかのアレイを含むウェハが必要とされる場合には、ネガティブレジストをスピニングすることが好ましい。何となれば、スピニングは層の厚さに対して最良の寸法制御を与えるからである。また、生物活性成分が既にパターン化された構造に含浸される場合には、それは勿論それ程不経済ではない。しかしながら、異なるセンサーのアレイが単一ウェハで必要とされる場合には、それぞれの生物活性成分をネガティブフォトレジストと予備混合し、次にその混合物をウェハ上の適当な場所で微小分配することが更に有効である。また、異なる生物触媒の溶液は、それぞれの確立された担体マトリックスに導入し得る。全ての混合物が分配された後、次に構造が単一パターンニング工程により形成される。混合物の微小分散は、自動制御スピニングを使用することにより行なわれ、その場合ウェハは、x、y、z-制御された真空チャックの上に置かれる。また、真空チャックは必要によりわずかに回転されてもよく、チップの基準軸をチャックの旋進軸と配列させる。一般に、触媒電極の直径の約3倍の領域を覆うに十分な材料を微小分配することは、触媒電極の直ぐ上に実質的に平面状の領域を乾燥して残す。自動微小分配系の追加の詳細が項目

5.4および第12図、第13図に示されている。

【0151】この技術の変化がまた生物触媒以外の試薬を微小分配するのに使用し得ることが、当業者に明らかであるべきである。例えば、アデノシンホスフェート（ADP）およびグリセロールを含む試薬が ATP センサーの付近に微小分配し得る。この試薬はセンサーの操作中の添加溶液により溶解し得る。加えて、試薬は、ウェハを切断する場合にダイシングのこを冷却するのに使用された噴射水に暴露し得ないような状況があり得る。即ち、試薬が水溶性化合物、脂質膜、等を含む場合、ウェハは部分切断され（ダイシングのこはウェハ表面を刻むのに使用され、その結果、それは加工後に刻み線に沿って容易に破断し得る）、または完全に切断される。後の方法では、市販のダイシングのこ（例えば Micro-autonation Inc., サンタクララ、CA または Kulicke and Soff a Industries Inc., ウィロウグロブ、PA により供給されるダイシングのこ）を使用するウェハダイシングは、金属フレームの中央に平らなプラスチックシートで取り付けられたウェハを用いて行なわれる。ウェハが完全に切断される場合、個々のチップはプラスチックに付着されたまま残る。こうして工程および反覆距離が維持され、そして微小分配法が更に行ない得る。金属フレーム上でプラスチック裏材料を使用するこの技術は、部分的に切断またはけがされたウェハを破断することにより得られたチップよりも滑らかな端部を有する個々のチップを与える。従って、関連の共同未決米特許出願第

245, 102号明細書の使い捨て検出装置の如き、更に良好な取り付け組立装置が製造し得る。

【0152】このような微小分配層は、スピン被覆により得られた層のように乾燥した後、ベース・センサーの上方の領域で殆ど平面状であることが発見された。パターンニング後のこの層の厚さは、主としてレジストの固形分、その粘度、支持体ウェハの表面エネルギー、およびその後の現像時間により調節される。表面エネルギーの考慮に関して、その表面は実際には微小分配材料を制御方式で散布するように上げることができる。例えば、指示電極の周囲の表面がポリイミドまたはジオキシジェン化ケイ素である場合、それは酸素、水、アルゴン、または酸素プラズマへの暴露により親水性にされる。(フルオロカーボン)プラズマ処理はジオキシジェン化ケイ素を親水性にするが、ポリイミドを疎水性にする(下記の項目5.4.1.3を参照のこと)。

【0153】写真平版マスクを通して光に露出されるタンパク様の層のこれらの部分のみが、勿論、還元金属種を含む。前記のように、鉄種が高酸化状態の金属として使用される場合、照射ウェハは、次に、その他の成分中に過酸化水素を含む水性現像液に暴露される。次に、還元金属種(この場合には、鉄(II)イオン)は溶液中に存在する過酸化水素と相互作用してヒドロキシルラジカルを生じ、局所で生成されるこれらのラジカルは架橋反応を開始し、これらの反応は支持体ウェハの露出領域へタンパク様マトリックスを“定着”するのに利用できる。タンパク様の層の未露出(未架橋)部分は、こうして同時に洗い去られる。別の好ましい実施態様では、ニクロム系が光増感剤として有益であることが留意される。この系の作用の機構は鉄系と異なることが明らかである。何となれば、淡水が現像液として有効に使用し得るからである。粉れもなく、本発明の指示および目的と合致するその他の光増感系が当業者に明らかであり得る。タンパク様マトリックスを“定着”するためのこのような均等な光開始手段は、当然に本発明の範囲および精神の内にある。

【0154】驚くことに、幾つかの酵素がこのようなネガティブフォトリジスト系の方法に適合し、そしてこれらの方法により失活または変性されないことが発見された。これらの酵素の例は、有機コファクター、例えばフラボプロテインを含むオキシドレダクターゼ：グルコースオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、NADHオキシダーゼ、およびグリセロール-3-ホスファートオキシダーゼ；活性部位で金属イオンを有するオキシドレダクターゼ、例えばウリカーゼ；ヒドロラーゼ、例えばクレアチナーゼ；およびキナーゼ、例えばグルキナーゼ、およびヘキソキナーゼを含むが、これらに限定されない。タンパク様マトリックス内に固定化し得る(または、マトリックス構造の確立に続いて導入される)その他の酵素は、ウレアー

ゼ、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチナーゼ、クレアチンキナーゼ、コレステロールエステラーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、アルカリホスファターゼ、アミントランスアミナーゼ、アスパルテートトランスアミナーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、γ-グルタミルトランスアミナーゼ、L-グルタメートオキシダーゼ、ピルペートオキシダーゼ、ジアルホラーゼ、ピリルビンオキシダーゼ、またはこれらの酵素および上記の酵素の適当な混合物を含むが、これらに限定されない。また、生物学上重要なその他の巨大分子、例えばタンパク質、レクチン、神経化学セプター、デオキシリボ核酸(DNA)の分子、リボ核酸(RNA)の分子、ポリペプチド、糖タンパク質、メタプロロチン、免疫グロブリン、コファクター、抗体、抗原、セプター、イオン/フォ、イオン交換樹脂、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド並びにこれらの混合物、活性フラグメントまたはサブユニットが、本明細書に記載されたネガティブフォトリジスト法により固定化し得る。しかしながら、上記の物質は、それらが光形成工程およびその後の現像工程の前に存在している場合には、紫外線、藍クロム酸イオン、鉄(III)イオン、鉄(II)イオン、架橋剤、または過酸化水素(或種の光増感剤を含む)への短期の露出に対して感受性であるべきではない。これらの条件下で変性または失活されるものは、例えば前記のように、更に下記のよう、パターンニング工程の後に水溶液として導入し得る。

【0155】好ましいタンパク様の厚さおよび多孔度は、センサーの最終の性質を調節するのに重要である。その層が厚すぎる場合には、応答が損なわれ、そしてそれが不十分に多孔質である場合には、その構造中に加えられる酵素の量は少なすぎる。一般に、タンパク様の厚さは約10nm-約0.5mm、好ましくは約0.05-約4μmの厚さの範囲であり得る。

【0156】酵素を含む殆どの生物活性の巨大分子は一般に経時分解することが注目されるべきである。従って、最も有利な全反応速度を与えるためだけでなく、センサーが貯蔵される期間にわたって定めておくことができず分解する生物活性分子(例えば酵素)の量を補償するためには、充分な生物耐性がバイオセンサーの固定層中に存在すべきである。タンパク様の層の厚さまたは多孔度欠陥を有して製造されたセンサーは、限られた貯蔵寿命または有効寿命を有することが避けられず、そして損なわれた性能特性を有する。それ故、本発明のきわめて重要な目的は、信頼性があり、そしてオーバーレイされたバイオ層を再現可能な制御可能な方式で確立する微小製作法を提供することである。

【0157】この目的と合致して、その層の厚さは、就中、ネガティブフォトリジスト中の固形分、スピン速度、および現像時間により調節し得ることが発見され

た。一方、架橋層の多孔度は、例えば、ラジカル脱除剤（造粒基抑制剤）でありこうして架橋度を妨げ得る或種の試薬をネガティブフッ素化レジストに添加することにより調節し得る。一つのこのような試薬はソルビトールである。その他の多孔度改善物質は、単糖類、二糖類、少糖類、多糖類、糖アルコール、簡単な塩、またはこれらの組合せを含んでもよい。こうして、本発明の好ましい実施態様に於いて、光形成性セラチン層は約0.01〜約4 g/dlのソルビトールを含むように配合される。多すぎるソルビトール、例えば5 g/dl以上のソルビトールは、殆ど架橋を受けず、それ故、光形成性ではない組成物を生じる。

【0158】また、固定層の多孔特性は操作可能なバイオセンサーの初期の“ぬれ”段階を助けることが記載されるべきである。この段階は、制御された湿度環境下で実質的に乾燥されて貯蔵されるバイオセンサーの“湿潤”および乾正を伴う。この方法を加速するあらゆる構造上の特徴は、結果が得られる前に必要とされる待ち時間を短縮する。

【0159】本発明の方法に従って、上記の生物活性分子またはその組合せを組み込むことにより、広範囲の分析対象が所定の全体として微小製作されたバイオセンサー装置中でそれぞれ選択的に検出でき、そして定量的に測定し得る。関係する分析対象の代表群は、就中、溶解量および合計量のジオキシジェン化炭素、一酸化炭素、アミノ酸、ジオキシジェン、エタノール、イオン化カルシウム、ナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン、水素イオン、塩化物イオン、マグネシウムイオン、アモニウムイオン、過酸化水素、アスコルビン酸、グルコース、コレステロール、尿酸、エステル化コレステロール、尿素、クレアチニン、クレアチン、トリグリセリド、ラクテートデヒドロゲナーゼ、クレアチンキナーゼ、アルカリホスファターゼ、クレアチンキナーゼ-MB、アラントインアミナーゼ、アスパラテートトランスアミナーゼ、ビリルビン、アミラーゼ、リパーゼを含む得るが、この列記は決して排他的ではない。

【0160】本発明のバイオ層は、生物活性分子が所定の装置の予め選択された領域に均等に組み込まれるような広範囲の用途に有用性を有する。バイオ層が表面を横切ってスピン被覆され、塗布され、スクリーン印刷され、浸漬され、あるいは微小スポットとして分配されようとも、それらは、例えば、写真平版により計画的な正確な領域に局在化し得る。おそらく、これらの材料は、例えば診断系またはキットの部分を含むあらゆる表面に適用し得る。試験の精密部品は試験表面の異なる部分に分散でき、その後、試験の実際の実施中に組み合わされるだけである。このような二元系、三元系、または多成分系は色素産生試薬を含むことができ、この試験系はその後、特徴的な色を生じ得る。

【0161】また、フィルム形式性ラテックスがリアクタービーズ、中空繊維、またはバイオリクターの内壁に被覆されてもよく、反応性基質の化学変換を促進し得る。その他に、1個または一つの型より多いバイオ層が確立されてもよく、一連の変換を行なって、例えばアデノシントリホスファートのような複雑な分析対象または一種より多い分析対象（例えば、グルコースおよびグルコース）の全検出をもたらす。明らかに、フィルム形成層は、例えばタンパク質の層の上に微小分配されてもよい。また、その逆の配列、即ち微小分配されたフィルム形成性ラテックス上のタンパク質の層がまた得られてもよい。また、複数のタンパク質の層が容易に確立されてもよい。当業者は本発明の組成物のわずかな改良またはその他の適用を容易に推考でき、これらは本開示から全く当然に生じる。これらの広範な有用性のため、このような当然の拡大は本教示の範囲および精神の内にあると考えられ、そして本発明の均等物と考えられる。

【0162】5.1.4. 分析対象減少 (AM) 層

これまで記載されたセンサーは、グルコースセンサーそのものとして機能し得る。即ち、この装置と接触して置かれたグルコース溶液は、試料中のグルコースの濃度に比例する信号出力（即ち、電流）を生じる。しかしながら、臨床上の実施では、二つの制限がなお解消される必要がある。第一に、このようなセンサーは、グルコース濃度の非常に狭い範囲で試料中のグルコースの濃度に比例する応答（即ち、線形応答）を有する。典型的には、この範囲は、グルコースの場合、約0.1〜約2.0 mM におよび、例えば糖尿病患者から得られる液体試料中に見られるグルコース濃度（1〜25 mM）の範囲には殆ど達さない。第二に、タンパク質、細胞、および全血のその他の成分、またはその他の生物液体はこのようなセンサーを迅速に汚損し、そして分析対象分子の様な輸送を妨げる。全血はその重質成分を除去するために最初に遠心分離または濾過し得るが、理想的には、そして最も都合よくは、全血に対して試験を行なうことが所望される。

【0163】前記のように、線形応答範囲の狭さは、主として、この箇所に記載される機能センサーに使用される酵素の固有の生化学的性質による。このようなセンサーは、殆どの臨床上のセッティングで最も理想的な方式で作用しない。

【0164】グルコースセンサーの場合、酵素グルコースオキシダーゼは4 mM程度に低いグルコース濃度で運動論上飽和されるようになる。その結果、センサーは、それより高い分析対象濃度では分析情報を与えない（即ち、応答は、0 次でさえも非線形になる）。低飽和レベルのこの問題の可能な解決は、グルコース、またはその他の所望の分析対象の成る一定の部分のみが、相反反応ジオキシジェン（式1）の輸送をかなり減少しないで、酵素を含む層に達することを可能にする或る手段を与えることを伴う。換言すれば、このような層は、バイオ

層に達する分析対象の量を減少する傾向があり、また気体透過膜として利用できる。減少された分析対象濃度の比率が充分に低い場合、分析し得る実際のグルコース濃度の範囲は非常に望ましいようになる。しかしながら、分析対象の量、ひいては酵素反応により生成される電気活性種の量が減少されるので、電流出力はまた必ず減少する。それ故、線形応答の所望度には過度に減少される信号出力に対して慎重にバランスをとる必要がある。

【0165】本発明の特別な実施態様に於いて、材料の追加の層（分析対象減少（AA）層と称される）は酵素を含む層即ちバイオ層の上に付着される。AA層の厚さは、活性酵素に達する分析対象の量を大きく支配する。それ故、その適用は厳密な加工条件下で行なわれる必要がある、そしてその寸法厚さは厳密に調節される必要がある。換言すれば、AA層は本発明の主目的の一つと合致するように確立される必要がある。薄すぎるAA層は充分な線形信号を与えることができず、一方、過度に厚い層は電流を過度に減少し、そしてまたセンサーの応答時間を遅延すると予想される。AA層を利用することで、外來材料によるセンサー汚損の問題がまた解消される。

【0166】下層の微小製作の場合のように、AA層に関する厳密な寸法制御に影響する重要な因子はAA材料そのものの組成である。これに関して、幾つかの型のコポリマー、例えばシロキサン非シロキサン部分のコポリマーが特に有益であることが発見された。これらの材料は、調節された厚さまで微小分配され、またはスピニング被覆し得る。また、それらの最終の構成は、本明細書に記載されたその他の不連続構造と合致するパターンニング技術および写真平版技術により設計し得る。これらの非シロキサンシロキサンコポリマーの例は、ジメチルシロキサン-アルケンオキシド、テトラメチルジシロキサン-ジビニルベンゼン、テトラメチルジシロキサン-エチレン、ジメチルシロキサン-シルフェニレン、ジメチルシロキサン-シルフェニレンオキシド、ジメチルシロキサン-α-メチルステレン、ジメチルシロキサン-ビスフェノールAカーボネートコポリマー、またはこれらの適当な組合せを含むが、これらに限定されない。コポリマーの非シロキサン成分の重量%は有益な値に予め選択し得るが、典型的にはこの割合は約40-80重量%の範囲にある。上記のコポリマーの中で、50-55重量%の非シロキサン成分を含むジメチルシロキサン-ビスフェノールAカーボネートコポリマーが好ましい。これらの材料は Petrarch Systems、プリストル、PA（米国）から購入でき、同社の製品カタログに記載されている。

【0167】AA層として利用できるその他の材料は、ポリリンタン、酢酸セルロース、硝酸セルロース、シリコングラス、またはこれらの材料の組合せ（相溶性がある場合、シロキサン非シロキサンコポリマーを含む）を含むが、これらに限定されない。

【0168】本発明の好ましい実施態様に於いて、塩素

化溶媒と芳香族溶媒の混合物中のジメチルシロキサン-ビスフェノールAカーボネートブロックコポリマーの溶液がウェハにスピニング被覆される。また、エーテル系溶媒およびカルボニルを含む溶媒が溶媒混合物中に有利に使用し得る。この層の厚さは混合物の不揮発分およびスピニング速度により調節される。グルコールに対するその多孔度はまた溶媒組成により調節される。好適な溶媒の例は、ジフェニルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、塩化メチレン、トリクロロエタン、テトラクロロエタン、クロロベンゼン、ジクロロベンゼン、フェネトール、2-メトキシエチルエーテル、アセトフェノン、プロピオフェノン、およびシクロヘキサンを含むが、これらに限定されない。

【0169】AA層の厚さは約2nm〜約10μmの範囲であり得るが、殆どの用途には約5nm〜約10nmであることが好ましい。薄層は低分子量の分子（例えば、約100〜約3000の分子量を有する分子）の減少に最も有益である。層が充分に厚く、そして適当な溶媒系から流延される場合、それは気体透過層として作用でき、この場合、アンモニア、ジオキシジェン、または過酸化水素のような気体分子のみが透過し得る。ポリマーフィルム性質は、その厚さと共に、分析対象減少層が気体透過層になる寸法限界値を支配することが理解されるべきである。使用される特別なポリマー材料に応じて、所定の層はその他の層に対して小さいか、または大きい厚さで気体透過層として作用し得る。所定の材料の所定の機能に関して厚さの有効範囲を決めるルーチン実験は、当業者の能力内にあると見なされる。一般に、好ましい材料に関して、約5〜1000nmの厚さを有する層はAA層として機能でき、一方、約100〜5000nmの厚さを有する層は気体透過膜として機能する。それ故、厚さ範囲の或る重なりが予想される。

【0170】AA層の確立の重要な特徴は、下層の機能および性能、特にバイオ層が下に存在する場合の酵素の活性に影響することのない、ポリマー層の好結果のパターンニングである。AA材料により覆われた領域を局在下し、そしてそれがセンサーのその他の機能上の特徴を妨害する場合にそれはウェハの領域から除去することが望ましい。例えば、接触パッド、1（第1図）は、マイクロプロセッサユニットと電気接続するそれらの能力を阻害されないことが必要である。

【0171】AAコポリマー層をパターン化するため、酵素を含む層に使用されたのと同様のゼラチン系ネガティブフォトレジスト（NP66として知られる）がポリマー層の上にスピニング被覆され、パターン化されて、AAコポリマーが必要とされる場合にのみフォトレジストを露光する。このネガティブフォトレジストはNorland Products Inc., New Brunswick, N.J. から市販されている。次に、過剰のAAコポリマーは、水酸化カリウムまたは水酸化テトラメチルアンモニウムアルコール性溶液を含

み得る塩基性エッチング剤への暴露により除去し得る。レジストキャップはグルコースセンサーの応答に影響しないことが発見され、それ故、その後のその除去は任意である。明らかに、当業者に知られているその他の水系フォトリソがまたAA層をパターン化するのに使用し得る。

【0172】第6図を参照して、本明細書に開示されたグルコースバイオセンサーの応答はAA層の存在により非常に広い範囲のグルコース濃度で線形であることがわかる。AA層を使用しないと、そのセンサーは未希釈の生物物質に使用するのにはそれ程適さないようである。

【0173】5.1.5. 仕上り工程および追加の実施態様デバイス作製の最終工程は、ウェハを個々のグルコースセンサーに分割するダイシング工程を包含する。この工程は、ダイヤモンドを埋め込んだ回転刃と、回転刃の冷却、削りくずの除去等のためのウォータージェット噴出手段とを備えた自動装置を用いて行うのが好都合である。この比較的正確な工程により、基板ウェハ上に存在する最も強固な薄膜構造以外の全てを効果的に破壊することができ。事実、本発明によるグルコースセンサーに対し、その選択性、感度および総合特性に有害な影響を及ぼすことなく該工程を実施し得ることが確認されている。このことは本発明にとって特に有意義である。それ故、本発明は、生理学的、生物学的、医学的に有意な分子を分析するためのセンサーとして使用し得るマイクロコンポーネントを作製するための、真のマイクロ製法を提供するものとする。

【0174】それにもかかわらず、場合によっては、該センサーのバイオ活性層を含む構造を形成する前に、自動回転刃を用いてウェハを「スクラップ」しておくことが好ましい。このプロセスには、ウェハ上の個々のセンサーの輪郭を定めるための部分スクラップ工程が含まれる。このスクラップは、作製の最終段階における最終切り離しに役立つものであるが、両段階の間に存在する諸工程において、ウェハをなおも構造的一体性を有する状態にとどめるものである。このスクラップ工程については、後記実施例においてより詳細に説明する。

【0175】タンパクフォトリソ固定法に基づくその他のタイプのセンサーが実施例に記載されている。それらの多くは、分析対象分子とコファクターが関与する酵素触媒反応により生成した電気活性種（例えば、過酸化水素、ダイオキシジェン）を利用する電流測定装置を用いるものである。具体的実施態様には、酵素ウリカーゼを含む混合物をあるセンサーに微量適用することにより形成した薄膜をパターン化し、これにより尿酸センサーを作製するものが含まれている。さらに、2種の混合物、すなわちグルコースオキシダーゼを含む混合物、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールエステラーゼを含む混合物をセンサーに微量適用することにより、グルコース兼コレステロールセンサーを作製すること

ともできる。2種以上の酵素を共同固定したアデノシン-5'-三リン酸センサーの例も記載されている。これは、例えば、グリセロールキナーゼおよびグリセリン-3-リン酸オキシダーゼを含む混合物を微量適用することにより形成される。これらの例は、本発明のマイクロ製法が一般的なものであることを示すと共に、当該化学トランスフォーメーションに必要とされる、適宜の触媒（例えば、酵素）および/または試薬（例えば、アデノシン三リン酸、ADP等）が利用可能であり得ることを示している。

【0176】5.1.6. 電流測定によるダイオキシジェンセンサー、電解質層、およびその他の選択透過層 本明細書中の多数の箇所に記載するように、本発明の実施態様は、用途、分析の種類等に反応し、極めて柔軟性に富むものとして行うことができる。例えば、既に、中性または荷電した分析物を消費し、付随的に H_2O_2 を生成するバイオ触媒システムと結合した過酸化水素センサーについて記載したが、ある一定の状況下においては、ダイオキシジェンの濃度が、より好都合なモニター対象となり得る。

【0177】本技術分野の当業者は、ダイオキシジェンが、多数の酵素触媒プロセスにおいて消費されることを認識している。したがって、分析対象となる基質に対する酵素の作用の結果として起る、試料中のダイオキシジェン量の減少をモニターすることも可能である。ダイオキシジェンセンサーの一態様として、第7図に示したような、チタン層の上に積層した金の指示電極を包含するベースセンサーがある。このダイオキシジェン ベースセンサーの金属成分は図示のとおりであり、好ましい電気触媒金属5が金である点を除いて第2図に示した過酸化水素触媒に極めて類似している。第7A図および第7B図における層構成は基本では同一であり、厚に、電解質層12、ガス透過層8、フォトリソキャップ層9から構成されている。主要な相違点は、第7Bのものでは、ガス透過層8がその下の電解質層の全体を効果的に包囲しており、それ故、電極領域で外部の流体からより効果的にシールドしている点にある。しかしながら、そのような構造は、第7A図のものより、ウェットアップ (wet-up) により長い時間を要する。電解質層およびフォトリソキャップに使用する材料としては、本明細書に記載したような、露光により形成し得るタンパク混合物が好ましい。ガス透過膜 (AA層) は、好ましくは、先に記載したシリコン/ノンスilicon共重合体を用いて形成される。

【0178】第7A図の構造は、単一の露光工程により、下層の電解質層および上層のフォトリソキャップ中で光重合反応を起こすことにより形成可能であり、このことは、処理の観点から注目値する。他方、第7B図のダイオキシジェンセンサーの構造は、まず第1に

放射線への露光を必要とし、ついで下層の電解質層を形成するための現像工程を必要とする。次に、AA材料、続いてフォトリソト キヤップが形成される。さらに、フォトリソグラフィ マスクを通して第2の露光を行い、適当な現像液中で現像することにより、所定の領域に最終構造を形成する。単一露光法においては、全ての露光層が光照射によるマトリクスを形成し得る適切な光量となるように、露光条件を調節しなければならない。しかしながら、そのような露光は、介在層（この場合、ガス透過層）が放射線をそれ程吸収しない場合においてのみ可能である。したがって、AA層は、放射線（例えば、紫外線）を強く吸収しない材料を使用すべきである。好ましい材料の例としては、例えば、シロキサン/ノシロキサン共重合体がある。

【0179】上記記録のダイオキシジェンセンサーに関し、さらに次の2側面が注目される。まず第1に、ガス透過層は、小さい気体分子（例えば、ダイオキシジェン）のみが効果的に該センサーの電極部に到達するような厚さとすることができる。それ故、この方法により、分析に干渉する電気活性種を電極表面から実質的に排除することができる。その様なガス透過層は、選択透過シラン層と同様の選択透過機能を果たすことから、代替物として使用可能である。第2に、電極構造を囲む電解質層は、その上に存在する上層構造と共同して、外乱に対する「保護環境」を作り、そのような環境下において金属表面でのレドックス反応を起こすことができる。換言すれば、電極の表面に到達するレドックス反応種の量は、ガス透過層および電解質の構造に支配され、外部の流体試料の流れまたは外乱要因から独立したものとなる。さらに、電解質層—これは、通常の操作条件下において水和している—は、ダイオキシジェンのレドックス反応に対し、プロトンを供給するものとすることができる。このような多層デバイス、より信頼性に富み、露出した金属電極構造と比較して、より正確で再現性に富む測定値を与える。

【0180】第8図に示した構造は、本発明の上記記録に関連するものである。第8図Aにおいては、バイオ層7が、第7図のようなダイオキシジェンセンサーのガス透過層の上に重ねられている。AA層およびフォトリソト キヤップ9は、前述のように、バイオ層の上に設けられている。該バイオ層中に存在するバイオ活性分子がグルコースオキシゲナーゼである場合には、得られたセンサーはグルコースセンサーとして機能し、ガス透過層は、前述の選択透過シラン層と同様の機能を果たす。

【0181】これに対し、第8B図の構造のデバイスは、電解質12およびガス透過層8'を、流体の外乱すなわち試料の流れから保護する利点を有する（同構造のデバイスについては、後記2.5においてさらに説明する）。該デバイスでは、リガンドリセプター（すなわち免疫種）45を層構造の外表面（例えば、フォトリソト キヤ

ップ9の外表面）と共有結合により結合させるために、カップリング手段40が使用されている。後記のように、そのようなデバイスは、リガンド/リガンド受容体に基づくバイオセンサー（LLR バイオセンサー）として有用であり、本発明による完全マイクロ化バイオセンサーデバイスによって外部の流体試料の動きに過敏になることなく検知または分析し得る分析物の範囲をかなり拡大する。

【0182】5.1.7. グルコースセンサーの性能
第5図には、内蔵の銀/強化銀参照/向流電極によるグルコースの定常状態電流が、グルコースセンサーの検出ポテンシャルの関数として示されている。図中、—○—○—は、HEPES緩衝液（NaCl 100mM含有、pH=7.4）を5.0mM含む溶液に対する測定値であり、—×—×—は、20mMのグルコースを含む同じ溶液の測定値である。+300〜600mVのポテンシャルにおける電流は、グルコースオキシゲナーゼ酵素によるグルコースの酵素酸化に由来する過酸化水素のイリジウム電極表面における酸化に基づくものである。−200〜−100mVのポテンシャルにおける電流は、イリジウム電極表面での過酸化水素の還元に基づくものである。過酸化水素の酸化、還元の間方において平坦部が観察されるのは、該バイオセンサーの電流が、先に述べたように、グルコースがAA層を通り酵素層中に運搬される速度により制限されることを示唆している。

【0183】第6図は、該グルコースセンサーの校正曲線であり、+350mVにおいて測定された定常状態電流をグルコース濃度の関数として示している。さらに実験を行ったところ、電流レスポンスは、(i) 生物学的流体において一般に観測されるpH値（例えば、pH6.8〜8.2）の範囲内におけるpH値の変動、(ii) 20〜200mMの範囲内におけるダイオキシジェンの分圧、および (iii) 濃度50〜200mMの範囲内における塩素イオン濃度の変動にはほとんど影響されないことが示された。本バイオセンサー、および本発明によるその他の電極のバイオセンサーは、本願と共に出願した米国特許出願第245,102号、第187,665号（これらの開示内容は全て本願に組み入れられる）の主題であるデバイスと共に、人の血液、血清、全血等の生物学的流体中におけるグルコースまたはその他の分析物の濃度レベルの測定に使用することができる。

【0184】5.2. バイオアッセイまたは化学テストに用いられるリガンド/リガンド受容体に基づくバイオセンサー（LLR バイオセンサー）

本発明の他の実施態様において、本発明のバイオセンサーは、分子間親和力および/または免疫化学的複合相互作用に基づく分析の実施に適用することができる。そのような相互作用は例えば、抗原/抗体、抗体/抗体、ピロチン/アピニン、免疫グロブリンG/タンパクA、酵素/酵素受容体、ホルモン/ホルモン受容体、基質/酵素、DNA（またはRNA）/相補ポリヌクレオチド配列、薬物/薬物受容体等、多数の相補リガンド/リガ

ンド受容体間において発現する。したがって、上記複合体の一方を分析対象とし、他方をセンサー上に固定したリガンド受容体または免疫種として使用することにより、分析を行うことが可能である。

【0185】一般に、まず第1の成分（例えば、リガンド受容体）が、バイオセンサーの所定の領域（好ましくは、指示電極上）に、例えば、共有結合、吸着等により、固定される。次に、リガンド（すなわち、分析物）が、親和、免疫、相補等による複合体を形成することにより、これに結合される。ついで、使用する分析法（例えば、サンドイッチ分析）に応じ、適切な標識を付された第2の成分が導入され、該分析物と結合される。最後に、この標識物に対する基質が導入される。このようにして、ダイオキシジェン、過酸化水素等の電気活性種が生成（または、消費）され、下方に存在するベースセンサーにより好都合に定量される。この第2の成分（基質）は、一般に、分析物を含むと考えられる試料を処理する、またはそのような試料と混合するための試薬とすることができ、そのような試薬は、さらに、分析物との相互作用を増強し、または、生成される検出可能物の濃度変化を増幅するための添加物を、含んでいてもよい。

【0186】このリガンド/リガンド受容体に基づくバイオセンサー（LLRバイオセンサー）の他の態様において、第1の成分は、官能化されたシリコン層に共有結合により固定される。その際、架橋剤（例えば、グルタルアルデヒド、エクロロヒドリン等）を使用することも可能である。好ましくは、免疫活性種またはリガンド受容体が、第7図または第8図に示したタイプの構造を有するセンサーの最外層に共有結合される。そのような構成は、5.1.6で説明した積層構造による利点を全て享受する。ここでもまた、該ベースセンサーは、過酸化水素（例えば、イリジウムの場合）、またはダイオキシジェン（例えば、金の場合）に予め曝露しておくことが可能である。

【0187】具体的な分析法は、当業者ならば容易に選択可能であり、それは、例えば、既存のサンドイッチ分析、競合分析等に基づくものであってよい。ベースセンサーが、電気化学的デバイスである場合には、免疫学、分析学等において興味を持たれている物質の定量、定性分析に特に有用である。

【0188】5.2.1. 免疫分析に適するLLRバイオセンサー

既存のサンドイッチ分析に基づく分析法を利用するLLRバイオセンサーの例として、抗原、抗体間の一般的相互作用を利用するものを挙げることができる。この場合、例えば、本発明によるベースセンサーの上に、検出対象である特定の抗原に結合する能力を有する抗体（第1成分）を固定することにより、当該抗原の存在を検出することができる。作製された LLRセンサーは、当該抗原の

存在量について検査すべき試料を含む混合物と接触され、ついで直ちに標識された抗原特異性抗体（第2成分）と接触される。引き続き添加される基質と標識物との反応に基づいて、分析物の測定が行われる。あるいは、抗原（第1成分）をベースセンサー上に固定し、抗原特異性抗体を分析対象とすることもできる。この場合、抗体を含む第2成分を、被分析物と結合させてもよい。この第2成分もまた、酵素（例えば、アルカリフォスファターゼ）により標識される。ついで、基質が導入される。

【0189】先に記載したように、抗体（または抗原）は、シリコン層上に存在する官能基に、直接または架橋剤を介して、共有結合してもよく、あるいは、非共有結合的に（例えば、吸着により）付着していてもよい。さらに、フォトレジストキャップ（好ましくは、タンパクを含むもの）が存在していてもよい。この場合、タンパクは種々の官能基、特にアミノ基およびカルボキシル基を有していることから、前記第1成分は、これらの官能基と共有結合させてもよい。

【0190】ベースセンサーは、電位により過酸化水素またはダイオキシジェンの電気化学的変換を起し得る、電流測定用電気化学デバイスから選択することができる。好ましくは、抗体は、本技術分野において周知のカップリング手段により、ダイオキシジェンセンサーの最外層に固定される。この場合、タンパクまたはタンパク混合物を含む材料により最外層を構成し、そのような層を指示電極上に配置することにより、第8B図に記載したような構造とすることが好ましい。

【0191】LLRバイオセンサーの他の態様として、先に記載したような選択透過シリコン層（この層は、接着強化層としても機能する）を備えた過酸化水素ベースセンサーが挙げられる。この選択透過シリコン層は、もし該層が存在しないとするばベースセンサーと接触し、分析物と干渉するか、あるいは反応成分（あるいは試料自体）のインキュベーション中に分析に干渉するであろう物質に対するスクリーンとして有用である。好ましくは、シリコン層は、ベースセンサーの所定の領域に限定される。

【0192】シリコン化したベースセンサー（あるいは他の電解質/ガス透過層）を有するウエハは、好ましくは、5.1.5に記載した如く、免疫反応物質含有層が形成される前にスクライプされる。スクライプされたウエハは、グルタルアルデヒド（または、当業者に公知の適当な架橋剤）の溶液に浸漬され、ついで所望の第1成分の溶液に浸漬される。得られたウエハは、ついで、個々のチップ（すなわちデバイス）に分割される。

【0193】（先行技術およびこの発明の開示で用いられる）「基質」の語は、2種の基質の一方のみを指し、ここに注意すべきである。ベースセンサーについて論及している場合には、「基質」はトランスジューサーの基盤を形成する実質的に平坦な表面またはウエファークに言

及している。開示の内容が酵素的処理に焦点がある場合には、「基質」はその酵素的処理により転換される化学的種に言及している。）

【0194】5.2.2. 電気化学分析の実施法

本発明による電気化学分析は、多くの分析物に適用可能である。分析法としては、本発明による新規なバイオセンサー（これは、以下に詳述するとおり、電極として機能する）を、電気活性種の濃度検出に用いるサンドイッチ分析、競合分析等がある。

【0195】サンドイッチ分析においては、分析試料および基質コンバーター成分で標識された第2成分（検出受容体）とを含む溶液が作成される。分析物が存在する場合には、分析物と第2成分から、複合体が形成される。サンドイッチ分析においても、第1成分（分析物捕獲受容体）を固定した LLRバイオセンサーが使用される。分析物と第2成分から形成された複合体は、バイオセンサーと接触され、バイオセンサー上に捕獲受容体/分析物/検出受容体から成る複合体を形成する。ついで、バイオセンサーは、複合体を形成しなかった成分を除去するため、洗浄される。次に、複合体が結合しているバイオセンサーを、非電気活性基質と接触させると、第2成分の標識物が基質と反応する。この反応の結果、直接的または間接的に電気活性種の濃度変化を持たず（すなわち、過酸化水素が生成し、および/またはダイオキシジェンが消費される）一連の反応が起り、この変化が電気化学的に測定される。この測定より、試料中の分析物濃度に対応する測定値が得られる。

【0196】本発明の他の態様において、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）による競合分析が行われる。この分析法では、捕獲受容体をバイオセンサーに結合させ、ついで受容体を結合したバイオセンサーを分析物を含む試料と接触させる。これによって、分析物を基質コンバーターで標識した試薬の一定量と、試料中に含まれる分析物とを競合させることにより分析が行われる。別法として、細胞状材料の表面に保持された分析物を含む試料を分析に使用することも可能である。バイオセンサー上に（分析物および標識分析物）/捕獲受容体から成る複合体を形成した後、バイオセンサーは、複合体を形成しなかった成分を除くため、洗浄される。洗浄されたバイオセンサーは、非電気活性基質と接触される。その際、該基質は、標識物と反応し、電気活性種の濃度変化を引き起こす。そのため、電極は、該酵素的反応によって生成され、または消費された電気活性種の還元または酸化を起し得る、所定の最速電位に保たれる。さらに、該電気活性種の濃度変化が測定され、所望の分析物の濃度に換算される。

【0197】本発明の好ましい態様において、電気化学サンドイッチ免疫分析または競合分析が適用される。

【0198】サンドイッチ分析の一態様において、抗原（受容体）を固定した免疫センサーが使用される。分析

すべきモノクローナルまたはポリクローナル抗体を含む試料が、酵素標識された抗原（または酵素標識された抗体）と混合され、混合物中に形成された抗体/（酵素標識抗原または酵素標識抗体）の複合体は、ついで免疫センサーと接触され、該免疫センサー上に固定された、抗原/抗体（酵素標識抗原または酵素標識抗体）から成る複合体を形成する。該免疫センサーは、複合体を形成した成分以外の成分を除去するため、好ましくは洗浄される。ついで、該免疫センサーは、非電気活性基質と接触され、その際、固定された複体の酵素成分が該基質と反応する。この反応により、直接的または間接的に、電気活性種の濃度変化を持たず（すなわち、過酸化水素を生成し、および/またはダイオキシジェンを消費する）一連の反応が起り、この変化が電気化学的に測定される。この測定の結果、試料中の抗体の濃度が求められる。

【0199】先に記載した抗抗体を使用する分析は、接着層（他の実施態様では、フォトレジスト層）に結合したアレルゲン（抗原）を第1成分（捕獲受容体）とし、IgGに対する抗体を第2成分（検出受容体）とするアレルギ-特異分析に特に適している。あるいは、第2成分として、IgGに対する抗体を使用することにより、アレルゲンに対する IgG の反応を測定することも可能である。

【0200】サンドイッチ免疫分析の他態様においては、モノクローナルまたはポリクローナル抗体（捕獲受容体）を電極上に固定することにより、免疫センサーが形成される。分析すべき抗原を含む可能性のある試料が酵素で標識された抗体（検出受容体）と混合され、混合物中に形成された抗原/酵素標識抗体の複合体は、ついで免疫センサーと接触され、該センサー上に固定された抗体/抗原/酵素標識抗体から成る複合体を形成する。この免疫センサーは、前述のサンドイッチ免疫分析手法に従って処理され、試料中の抗体濃度が求められる。これに関し、本発明の特定の実施例について図解説明した第14図を参照されたい。

【0201】競合分析の一態様においては、抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）に結合した抗原を有する免疫センサーが、分析すべき抗体と、酵素標識した一定量の抗体とを含む試料と接触される。該免疫センサー上に（抗体および標識抗体）/抗原から成る複合体を形成した後、試料中の複合しなかった成分を除去するため免疫センサーを洗浄する。ついで、免疫センサーを非電気活性基質と接触させる。その際、基質は、標識物と反応し、電気活性種の濃度変化を誘起する。このため、電極は、酵素的反応により生成および/または消費された電気活性種の還元または酸化を誘起し得る、所定の最速電位に保持される。さらに、該電気活性種の濃度が測定され、所望の分析物の濃度に換算される。

【0202】競合分析の他の態様においては、抗原に結

合した抗体を有する免疫センサーが、分析すべき抗原と、酵素標識した一定量の抗原を含む試料と接触される。

【0203】通常、ここに記載した電気化学分析を実施する際には、分析すべき試料は、標識されたリガンド受容体と予め混合した後、LLRバイオセンサーと接触される。しかしながら、そのような予備混合およびインキュベーションは、必要な全ての相互作用が LLRバイオセンサー上で起る場合には、不要である。これは、固定された抗体/抗原/標識抗体から成る三成分複合体、すなわち「サンドイッチ」複合体が形成されるからである。ついで、結合しなかった物質（および電気活性種）が、前述のとおり、センサーから除去される。このステップには、非イオン性洗剤を含む洗浄液を用いることもできる。あるいは、洗浄液として、酵素標識に相補的な基質を含む溶液を用いることも可能である。あるいはまた、酵素に対する基質を導入する際に、結合しなかった物質を除去することもできる（すなわち、この場合、基質含有溶液が洗浄液としても機能する）。ついで、酵素反応により、電気活性種が生成および/または消費され、指示電極上でレドックス反応が進行する。分析は、この電気化学反応に基づく信号出力（電流）を計測することに

表 II

0₂またはH₂O₂の消費または生成を伴う
代表的相補的酵素/基質ペア^a

エンザイム	酵 素	基 質	電気活性種 ^b	
			消費	生成
1	グリホーゼ	尿酸	0 ₂	H ₂ O ₂
2	チロシナーゼ	チロシン	0 ₂	H ₂ O ₂
3	コレステロールオキシダーゼ	コレステロール	0 ₂	H ₂ O ₂
4	グリセリン-8-リン酸オキシダーゼ	グリセリン-8-リン酸	0 ₂	H ₂ O ₂
5	ピロリン酸オキシダーゼ	ピロリン酸	0 ₂	H ₂ O ₂
6	ブドウ糖	NADH	0 ₂	H ₂ O ₂
7	カタラーゼ	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	0 ₂
8	L-グルタミン酸オキシダーゼ	L-グルタミン酸	0 ₂	— ^c
9	ピロリン酸オキシダーゼ	ピロリン酸	0 ₂	H ₂ O ₂
10 ^d	ブドウ糖アセチルターゼ	BCIP	0 ₂	H ₂ O ₂
11	ブドウ糖オキシダーゼ	ブドウ糖	0 ₂	H ₂ O ₂

【0206】【注】

a：本表の内容は、適切な酵素/基質の組合せの取、特定の酵素（基質）に対して代替可能な基質（酵素）の表示のいずれに關しても決して報酬時ではない。したがって、本表は、使用可能な酵素およびそれらに対する基質を単に例示するものであり、本発明の範囲および有用性を限定するものと解すべきではない。

b：これら電気活性種は、消費、生成のいずれか、ま

よって行われる。出力電流の強度は、定常状態において指示電極上に存在する電気活性種の量に比例し、定常状態において指示電極上に存在する電気活性種の量は、測定すべき分析物の原濃度に比例する。本発明の実施態様においては、このようにして酵素結合免疫吸着分析（ELISA）、あるいは当業者に知られているその関連法およびその変法を、ここに記載したような完全マイクロリガンド/リガンド受容体に基づくバイオセンサーを用いて、実施することができる。

【0204】免疫活性物質または特定のリガンドを、ここに記載した方法またはそれと等価な手法により電気化学的に選択検出する際に使用し得る、酵素と基質の組み合わせを第II表に示した。同表中の酵素のうち、アルカリフォスファターゼ（これは、リン酸に作用する）は、ターンオーバー率が高いことから、最も好ましい。その他の酵素も、適用するシステムの条件によっては、好ましい場合がある。当業者は、与えられた条件に最も適する特性（例えば、安定性、特異性等）を有するものを容易に決定することができる。

【0205】

【表4】

たはその両者に該当するものである。

c：BCIP=ブROMOKROロロインドキシル フォスフェート。エステラーゼ酵素に対し、インドキシル エステル（例えば、インドキシル アセテート）を使用することができる。

d：水が生成される。

【0207】ベースセンサー上に固定すべき免疫活性種の選択は、測定すべき分析物の種類に応じて定まるもの

であり、この選択は、当業者なら容易に行い得るものである。例えば、ある抗原（例えば、免疫グロブリンG）に対する第1成分受容体（捕獲受容体、例えば抗体）が、ベースセンサーに共有結合され、第1の受容体に対する（抗原上の）結合部と異なる（抗原上の）結合部を有する第2の抗体が、適切な酵素で標識される。次に、免疫グロブリンG（抗原）の含有量について分析すべき試料を、受容体複合体（酵素標識された抗体）と共にインキュベートし、ついで上記の置きLLRセンサーと接触させる。もちろん、分析すべき物質が抗体である場合には、バイオセンサー上に抗原を固定することができる。実施すべき分析の特性に応じ、工程の順序を入れ替えたり、変更を加えることも可能である。

【0208】恐らく最も簡便な分析は、試料、標識した抗体および基質を含有する混合物を調製することにより、実施できる。この混合物は、ついで、分析すべき抗原に特異性である第1の抗体成分を固定したLLRバイオセンサーと接触される。分析物の量は、該センサーからの信号出力を、その近辺に固定抗体（第1成分）が存在しないか、固定抗体が抗原と反応しないバイオセンサーからの出力と、比較することによって行なわれる。この場合、これら両信号の出力の差が、分析試料中の抗原の濃度を示すこととなる。

【0209】上記本発明の適用例中、サンドイッチ分析においては、分析物/標識された第2の受容体から成る複合体が形成された後に、免疫センサー上に複合体を形成すること、競合分析においては、標識された分析物、標識されない分析物の両者を含む試料を用いて免疫センサー上に複合体を形成することを強調したが、この分析手順を変更することも可能である。例えば、サンドイッチ分析において、分析物を含む試料と免疫センサーとを接触させる前または接触させた後に、第2成分（検出受容体）を免疫センサーと接触させることも可能である。競合分析の場合には、分析物を含む試料を免疫センサーと接触させる前、または接触させた後において、標識された分析物と接触させることも可能である。

【0210】後記実施例に記載したように、本発明は、電気活性種を測定することによって、特定タイプの分析物を分析することを包含するが、同様の分析を広範な分析物に適用することも可能である。適用可能な分析物の例としては、例えば、IgG、IgM、プロスタット酸（prostatic acid）ファスファターゼ、前立腺特異抗原、 α -フェトプロテイン、がん胎児性抗原、リウマチ性ホルモン（leutenizinghormone）、コリオゴナドトロピン、クレアチン キナーゼ等が挙げられる（但し、これらに限定されない）。さらに、分析物と結合した物質を含む液体試料、例えば、バクテリア、寄生虫、菌、ウイルス等（例えば、*Neisseria gonorrhea*, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*、ヘパティティス、ヘルペス、

ルペラ、後天性免疫不全免疫ウイルス（HIV またはHTLV III）、サイトメガロウイルス、自己免疫抗体等）を含む試料を、細胞等をトラップする薄膜または抗原特異性の受容体を結合した薄膜を使用することにより、検出することが可能である。

【0211】さらに、第1成分を選択的に固定するバイオセンサーを用いることにより、サンドイッチ分析を異なる手順で行うことも可能である。例えば、分析物を含む試料中に第1成分および第2成分を添加する。この混合物は、第1成分/分析物/第2成分から成る複合体を形成し、この複合体は、バイオセンサーに、第1成分を介して選択的に結合する。あるいは、該3成分混合物をバイオセンサーと接触させることにより、第1成分をバイオセンサー上に選択的に固定し、この固定した第1成分（分析物の捕獲受容体）に分析物および第2成分を順次複合させるか、分析物/第2成分付加物を複合させることができる。さらに、バイオセンサーを、まず第1成分および分析物を含有する試料に、ついで検出受容体と接触させることにより、第1成分/分析物/第2成分の複合物をバイオセンサーに結合した状態で形成することもできる。このようにして形成された複合体は、既述の方法に従って基質で処理することにより、分析される。

【0212】もし、異種の2分子間に何らかの親和力が存在し、その一方が電気化学デバイス上に（好ましくは、その最外層（例えば、シラン層またはタンパク層）上に存在する官能基を介して）固定可能であり、他方が標識可能であれば、親和力の種類を問わず、この方法を分析に用いることができる。したがって、例えば、ある酵素の受容体をバイオセンサーに固定することにより、当該酵素を本発明による分析法に従って検出することが可能である。この場合、該酵素に対する抗体を標識して用いることにより、バイオセンサー上に受容体/酵素/標識抗体からなる複合体を形成し、これを検出することができる。ここに記載した全ての分析において、モノクローナル抗体が使用可能である。

【0213】また、本発明による分析法は、核酸オリゴマーの検出にも使用可能である。この場合、バイオセンサーは、サンプル中の核酸物質に対するプローブ（受容体）としての核酸オリゴマーを結合することにより官能化される。例えば、プローブは、分析すべき核酸中の配列に相補的なDNAのオリゴマーとすることが可能であり、これを、ポリヌクレオチド、RNA、あるいは分析物としてのDNAとの結合の形成に用いることができる。分析物-受容体複合物の検出は、分析すべき核酸の非干渉領域に、相補的な第2の核酸オリゴマーを標識して用いることによって行い得る。あるいは、ポリヌクレオチド配列と、プローブとの間で形成されたハイブリッドを認識する抗体を、固定リガンド受容体として使用してもよい。その他のリガンド受容体、例えば、DNAと結合したタンパク等も使用可能である。

【0214】さらに、ある種の薬物に対する受容体を単離、固定することもできる。試料は、LLRセンサーと共にインキュベートされ、ついで、酵素との相互作用により電気活性種を生成（または消費）し得る適宜の基質を添加され、これにより結合した酵素の量が定量される。もちろん、酵素以外の標識物を用いるよう、この方法を変更してもよいが、用いる標識物は、電気化学的に測定可能な電気活性種（例えば、気体、その他の電気活性種）の生成または消費を誘起し得るものでなければならぬ。

【0215】本発明方法の実施、あるいは本発明によるLLRセンサーの製造を希望する者に対する一助とするため、表IIIにワーキングガイドを掲げた。しかしながら、分析物、固定受容体、および使用可能な方法の組合せは事実上無限に存在する。しかも、リガンド受容体（免疫活性種）の固定化には、同表に掲載したタイプ以

外のものの外表面または固層が使用可能であることは十分予測される。手許にある分析物に対し、何を適用するのが最も適切であるかは、当業者ならば容易に決定し得ることである。米国特許第4,366,241号、4,376,110号、4,486,530号および4,740,468号には、免疫分析の技術分野における、その他の方法および一般事項が開示されており、これらは、参考として、本明細書に組み入れられる。また、米国特許第4,184,849号には、凝集のための試薬のペアー（組み合わせ）が開示されており、これらペアーの一方を本発明によるLLRセンサーに固定し、他方を標識することが可能である。この場合、当該試薬ペアーの結合の阻害、および標識物の活性の阻害は、試料中に存在する分析物の量に比例する（あるいは、分析物の存在を示す）。

【0216】

【表5】

表 III

リガンド／リガンド受容体に基づくバイオセンサー（LLRバイオセンサー）を使用することにより検出／測定可能な分析物の代表例および適用可能な分析法の例

アナライズ	分 析 種	固 定 受 容 体	方 法
1	<u>ウイルス</u>		
	ルペラ、パラミクソウイルス （インフルエンザウイルス、 サイトメガロウイルス、アデ ノウイルス、ロタウイルス、 レトロウイルス（フレンド白 血病ウイルス、放射線白血病 ウイルス、ヒト免疫不全ウイ ルス）、A型肝炎、B型肝炎、 感染性単核球症、EBウイルス、 乳頭腫ウイルス	b, c	e, d
2	<u>マイコプラズマ</u>		
	肺炎マイコプラズマ	b	e
3	<u>寄生虫</u>		
	トキソプラズマ、ジアルジア、 アメーバ症	b	e

- 4 非性伝染病を含むバクテリア
サルモネラ、連鎖球菌、抗ス
トレプトマイシンO、レジェ
ネラ、ブドウ球菌、ヘモフィ
ラス、ナイセリア、クラミジ
ア、トレポネーマ b e
- 5 イーストおよび菌類
カンジダ、ヒストプラズマ、 b e
プラストミセス、クリトコッ
カス、球虫類
- 6 アレルギー発現物質
全IgB、特定アレルギーに対 b, c e, d
するスクリーン
- 7 免疫グロブリンおよびC-反応
性タンパク
IgG, IgM, IgA, IgD, IgE b e
(重鎖および軽鎖)
- 8 ホルモン
副腎皮質刺激ホルモン、 α - b e, f

フェトプロテイン、エストリオール、エストラジオール、テストステロン、アルドステロン、アンドロステンジオン、内分泌機能ホルモン（コルチゾル、プロスタグランジン、ヒト成長ホルモンおよびその変種）、生殖ホルモン（ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒトリユーティナイジングホルモン、卵胞刺激ホルモン）

9 甲状腺機能の評価に有用な物質

質

T 4、T 吸収、T 3、全甲状腺素、甲状腺刺激ホルモン

b

e

10 血液型決定因子、HLA、および血小板因子

第 8 因子、フォンウィルブラント因子、フィブリノーゲン／フィブリン分解生成物、血液型表面抗原、HLA 抗原、血小板因子 IV、および血液凝固

b

e

に関連するその他の因子 (外
因性および内因性)

11 自己免疫抗原および抗体

二重鎖DNA、一重鎖DNA、 b, c e, d
リユーマチ因子、スミス抗原、
スミス抗原ノリボ核酸タンパ
ク、免疫複合体、およびそ
他関連する抗原および抗体

12 アポリポタンパクおよびリポ
タンパク

Apo A-I, Apo A-II, Apo B, b o
Apo C-II, Apo C-III, Apo E,
HDL, LDL, VLDL

13 抗生物質

ジェンタマイシン、トブラマ b f
イシン、アマカシン

14 強心配糖体

ジゴクシン、ジギトキシン b f

15 抗ぜん息薬および抗てんかん

薬

トレオフィリン、フェニトイン	b	f
----------------	---	---

16 その他の医薬（毒物学研究用、

医薬スクリーニング用、医薬
乱用など）

プロカインアミド、フェノバルビタール、メソトレキセート、サリチル酸塩など	b	f
--------------------------------------	---	---

17 腫瘍マーカー、ガンおよびそ

の他の診断用の抗原

α1 酸グリコタンパク、酸フォスファターゼ、がん胎児抗原、CPK BB、α1 アンチトリプシン、α2 アンチプラスミン、β2 マイクログロブリン、フェリチン（貧血症）、トランスフェリン、セルロプラスミン	b	e
---	---	---

【0221】〔注〕

a：本表の内容は、適切な分析物、固定受容体の数、タイプ、範囲、および本発明による LLR バイオセンサーを用いて実施し得る分析法に関し、決して網羅的ではない。したがって、本表は、ほとんど無限の方法により広範な化合物が分析および/または検出可能であることを単に示すものであり、本発明の範囲および有用性がこれらに限定されるものと解すべきではない。

【0222】b：与えられた微生物、免疫グロブリン、抗原、成分、または薬物に対する抗体または受容体
c：与えられた微生物と結合した抗原
d：特定の抗体の存在を検出するための間接法

e：二重抗体サンドイッチ法
f：競合法

【0223】5.2.3. BCIP、BCIP 類似物、それらの誘導体の酵素分解物の新規な電気化学的検出法

本明細書に記載した酵素トランスフォーメーションに関連し、アルカリフォスファターゼに対する基質として一般に使用されている 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシル フォスフェート (BCIP) が、ダイオキシジェンの消費または過酸化水素の生成を誘起する酵素媒介ア

ロセスに対する基質としても極めて効果的に機能することが発見された。

【0224】したがって、本発明の一実施態様において、BCIP またはその適当な類似物が、電気化学分析に関連し、電気活性種の濃度変化を誘起するための試薬として使用される。その分析法および使用デバイス、好ましくは、本明細書中に記載されたものの中から選択される。しかしながら、通常の電極、電流測定装置も使用可能であり、上記のものに特に限定されるわけではない。

【0225】ここで、第14図を参照すると、受容体または酵素（好ましくは、アルカリ フォスファターゼ）で標識された分析物が、添加されたインドキシル フォスファターゼ基質 (BCIP) を、不安定な中間体を形成する加水分解物に変換する。続いて、自己酸化反応により、インジゴを生成すると共に、ダイオキシジェンを消費し、過酸化水素を生成する。そして、これに対応する O_2 または H_2O_2 濃度の変化が 5.1 に記載したように電気化学的に測定される。この電気化学信号から酵素活性のレベルを求め、これを分析物の濃度に換算する。

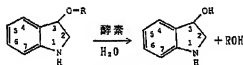
【0226】また、電気化学活性種の電気化学的検出は、電気測定装置を用いて行うこともできる。この測定

は、既存の比色分析や分光分析に悪影響を及ぼすような外乱や条件の変動に影響されることがない、好ましくは、電気活性種を生成（または消費）し得るフォスファターゼ酵素（BCIP、BCIP類似物、それらの誘導体（例えば、置換インドキシリン フォスフェート）に対する酸フォスファターゼを含む）の活性を、本発明によるマイクロバイオセンサーを用いて分析する。この分析法は、全く予期されなかった効率、感度を示し、多彩な臨床応用が可能である。

【0227】また、逆に、インドキシリン化合物のうち、その3位に、酵素より識別される官能基を有するもの（すなわち、加水分解可能なインドキシリン化合物、例えば、次式においてR=フォスフェートまたはアシルのもの）が均等物であることは、当業者には明らかであり、これらの抽出も本発明に包含される（なお、第II表に示した酵素/基質ペアを合わせて参照されたい）。

【0228】

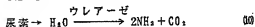
【化5】



【0229】5.3. 血液尿素窒素 (BUN) センサー
ウレア用の電位差化学センサーは、グルコースセンサー（前出）と同様に、官能的に異なる成分から構成されるシステムと見ることができ、血液尿素窒素 (BUN) センサーの一態様においては、分析物と接触する最外層を、同層中に尿素が浸透し得るよう構成すると共に、同層中に酵素ウレアーゼが固定される。この酵素は、次式のように、尿素のアンモニアおよび二酸化炭素への加水分解を触媒する。

【0230】

【化6】



【0231】上記式10に従って生成したアンモニアは、中性pH値においては主としてアンモニアイオンとして存在する。酵素含有層（最外層）と銀-塩化銀指示電極との間に、イオノフォア (ionophore) を含む層を設けることにより、電極面におけるアンモニウムイオン濃度を測定することができる。このタイプの測定法では、指示電極と参照電極との間の電位差が記録される。

【0232】電位差と分析物（この場合、尿素）の濃度の間には、ニコルスキーの式（下記1式）で示される関係が存在するから、この電気差から所望の分析値を求めることができる。

【0233】

【数3】

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \log \left(A \frac{a_a}{a_b} E_b K_{a,b} \right) \quad (3)$$

【0234】ここで、Eは測定された起電力（信号）、Rは気体定数、Tは絶対温度、nは分析種aの電荷の絶対値（例えば、アンモニウムイオンの場合はn=1）、Fはファラデー定数、Aは分析値aの活性度、Bは干渉する化学種bの活性度、K_{a,b}は分析種の活性度の電気化学電位測定に際し、化学種bが存在することによる影響に関する干渉係数、そしてE₀は、T、A、Bから独立した定数を示す。ニコルスキーの式の詳細に関しては、D. Amman の著「イオン選択マイクロ電極」(springer社、ベルリン、1986年発行) 第68ページ、および同書に記載されている参考文献を参照されたい。

【0235】5.3.1. BUNベースセンサー

本発明の好ましい実施態様において、BUNセンサーの単位セルには、薄膜銀/塩化銀参照電極と組み合わせで動作される薄膜銀/塩化銀指示電極を含む構成が採用される。

【0236】ここで第3図を参照すると、同図において、20aは、その上に二酸化シリコンの絶縁層15を有するシリコンのウェハ基板を示す。第1金属層10はチタンで構成され、このBUNセンサーにおいても、グルコースセンサーの場合と同じ機能を果たす。隣接層4、4'は、銀、塩化銀層である。第3図左方の指示電極には、さらに(i)有機ポリマー層（例えば、ポリビニルアルコール (PVC) 層）およびアンモニウムイオンのイオノフォアを含む半透膜2、ならびに(ii)このセンサーの例では、フィルム形成性ラテックス（例えば、ポリ（ビニルセーテービニルアルコール））および十分な量の酵素ウレアーゼを含む、最外層であるバイオ層11、が設けられている。

【0237】この単位セルの参照電極部は、第3図に示するような積層構造を有しているもよい。この態様において、参照電極の金属層および塩化物質は、電解物質層12でおおわれている。電解物質層はどのような材料のものであってもよいが、リソグラフィにより画成可能なものが好ましい。材料としては、無ゼラチンの銀製物が好ましい。この材料は、まずリソグラフィによりパターン化され、ついで塩化ナトリウムのような塩で飽和される。独立したガス透過層8が存在しているもよい。この層は、電解質（すなわち、塩）が分析試料中に失われるのを減少させ、試料の分析を始める前に参照電極の迅速なウェットアップ（すなわち、H₂O およびその他の小さいガス分子の透過）を許容する。パターン化プロセスの残留物であるフォトレジスト キャップ9は、もしそれが溶媒、溶質、イオン等の自由な透過を妨げない場合には、必ずしも除去する必要はない。好ましい態様においては、1988年2月16日出願の米国特許第07/156,262号に記載した参照電極が使用される（なお、同明細書の開示内

容は、参照用として本明細書に記入される)。あるいは、液体との境界と、銀/塩化銀の表面との距離が十分に大きくなるように参照電極を構成し、これによって指示電極と参照電極との電位差の測定を行うのに十分な期間、 Ag/AgCl 構造の隣接領域の電解質の濃度を実質的に一定に保つこともできる。

【0238】第3図に示されるように、BUNセンサーの指示電極の上には、ポリ塩化ビニル(PVC)バインダー、可塑剤としてのトリス(2-エチルヘキシル)フォスフェイト、イオノフォアとしてのノナクテン等から成るアンモニウムイオン選択性厚膜構造が存在する。指示電極は、上記と同じバインダーおよび可塑剤を用いると共に、異なるイオノフォアを使用することにより、異なるイオンに対して選択性とする事ができる。例えば、カリウム、ナトリウムまたは塩素イオンに対してイオン選択性の電極を作成するには、一般にバリノマイシン、モネンシンまたは(メチル)モネンシンがそれぞれ使用されている。その他の使用可能なイオノフォアの例としては、クワンエーテル、トリアルキルアミン、フォスフェイトエステル等がある(但し、これらに限定されない)。また、PVCの外に、他の重合体バインダー材料を使用することも可能である。その例としては、例えば、シリコンゴム、ポリテトラフルオロエチレン、イオン化し得る官能基(例えば、カルボキシル)を有するPVC誘導体、等がある。本発明で使用するのに適するその他の可塑剤としては、トリス(2-エチルヘキシル)フォスフェイト、ニトシロメン、2-ニトロフェニルオキシル エーテル、ジブチル セバケート、ジエチル アジペート、ナフタレート、アロピル カーボネート、5-フェルペンタノール、これらの混合物、等がある(但し、これらに限定されない)。当業者は、さらにその他のバインダーとイオノフォアの組み合わせを容易に考えることができるが、それらはいずれも本発明の範囲に包含される。作製された半透性のイオン選択性膜は、約 $2\mu\text{m}$ 〜約 $200\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $10\mu\text{m}$ 〜約 $30\mu\text{m}$ の厚さを有するものであつてよい。

【0239】次に第4図を参照すると、同図において、指示電極30および隣接の参照電極20、いずれもパッシベーションした信号線2によって、コンタクトパッド1に接続されている。ユニットセルは、シリコンウェハ上に規則的に数百回並んだ四辺形領域に画成されている。本発明のその他の実施態様において、アンモニウムイオンの測定に加え、その他のイオン種(例えば、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等)を同時に測定可能とするため、バイオセンサー上に、その他の指示電極を存在させることもできる。

【0240】5.3.2. BUN/バリオ層
ここで、粒状ラテックス (particle latex) の特性と、フィルム形成性ラテックスの特性を区別することは重要である。粒状ラテックスは、粒状の固体ポリマー構造(例えば、ポリスチレン)を含み、ポリマー粒子を水と

なじませ得る親水性物質でコーティングしたものである。そのような粒状ラテックス材料は、全ての形態のバイオ活性材料の固定に使用されている(例えば、D. Kraemer他の米国特許第4,710,825号参照)。しかしながら、本発明に用いる粒状ラテックスに関して重要なことは、乾燥後において、水中に容易に再分散するものであるとはならない、ということである。これに対し、フィルム形成性ラテックスは、親水性コーティングを有する流動性液体コア(例えば、ビニルアセート)から構成される。そのようなフィルム形成性ラテックスは、フリーラジカル触媒を含む水性媒体中に非水溶性有機モノマー(またはその混合物)を添加し、乳化重合することによって製造される。この重合は、例えば、機械的攪拌によって行われる(例えば、J.W. Vanderhoff, J. Polym. Sci., Polymer, Symposium, 1988, 76, 161-198参照)。このラテックスを乾燥すると、粒子が凝固し、水に決して再分散することのないフィルムが形成される。フィルム形成性ラテックスは、親水性成分、疎水性成分の両者を含有するから、バイオ活性種に対する安定的環境を提供すると共に、バイオ活性種を固定し、とどめめるための有効な媒体を構成する。

【0241】フィルム形成性ラテックスは、天然物、合成物の両者共極めて有用である。例えば、下記合成モノマー、その化学修飾物、共重合体および混合物を、フィルム形成性ラテックスに用いることができる: すなわち、酢酸ビニル、エチレン、アクリル酸、アクリル酸エステル、スチレン、ブタジエンなど。これら材料および当業者に周知の多数の材料が、Reichhold社、Air Products社、Du Pont社、Dow Chemical社、Imperial Chemical社を含む多数のソースから市販されている。天然イソプレンをベースとするポリマーも有用であり、例えば、Imperial Adhesives社; Chemical社、General Latex社; Chemical社等から市販されている。

【0242】さらに、フィルム形成性ラテックスは、非ラテックス水溶性成分(例えば、タンパク、酵素、ポリサッカライド(例えば、アガロース)、合成ポリマー(例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン)など)が、固相成分の約25%までの割合で存在する場合にもフィルム形成性を保持することが判明した。この点に関し、マイクロバイオセンサー作製上重要なことは、形成されたフィルムが、多量の添加剤(すなわち、酵素)の存在下においても平板状のウェハに効果的に接着することである。

【0243】種々の方法により、平板状基板の上に層を形成することができる。厚い層(約 $5\mu\text{m}$ 〜約 $200\mu\text{m}$)が必要な場合には、粘潤なフィルム形成性ラテックス組成物(Brookfield RV粘度計で測定して500センチポイズ以下)を少量適用するのが好ましい。薄い層(約 $0.2\sim 5\mu\text{m}$)が必要な場合には、より低い粘度を有する組成物を用い、その少量を指示電極上に直接適用しても

よく、あるいは、露光により指示電極上の領域のみが残るようにパターン化されたボジのフォトリソ（例えば、Shipley AZ 1370 SF）層上に微量適用するか、スピンコートされる。ついで、適宜の公知溶剤（例えば、*n*-ブチルアセテート等）を用い、レジストを、過剰のラテックスと共にリフトオフする。フォトリソキャップに用いた手法を用いることもできる。リフトオフおよびレジストキャップの具体例は、後記実施例に記載されている。

【0244】5.1.3に記載したように、微量適用した薬剤の拡がり方（ひいては、その寸法（例えば厚さ））を有利にコントロールするため、表面エネルギーを何らかの方法で制御してもよい。例えば、指示電極を囲むポリイミド層をフッ化炭素（例えば、 CF_4 ）のアラマで処理することにより、水性ラテックスの接触角が大きくなる（すなわち、水性ラテックスが広がる面積が最小となり、厚さが最大となる）。

【0245】ラテックス層中に1種またはそれ以上のバイオ活性種を固定するためには、ラテックスを適用する前にバイオ活性種を混合してもよく、あるいは、適用後にバイオ活性種を含浸してもよい。ラテックスの適用前または適用後に架橋剤を添加することにより、バイオ活性種（特に、酵素）の安定性を高めることも可能である。架橋剤は周知であり、例えば、グリオキサル、グルタルアルデヒド、メラミンホルムアルデヒド、ウレアホルムアルデヒド、フェノールホルムアルデヒド等を使用することができる。官能基を2個以上有するその他の架橋剤も好ましい。そのような架橋剤の例としては、例えば、ホルミル基に加え、ビニル、カルボキシ、アミノ、アミド、エポキシ、ヒドロキシ、シアノ、イソシアナート、チオまたはハロ基を有するもの；あるいは、これら官能基の安定な組み合わせを含有するもの（例えば、シクロアルキルエポキシド）が挙げられる。このような添加剤は、バイオ層の温度強度を高めるためだけでなく、完成したバイオセンサーの保存寿命を改善する。ほとんどの場合において、Elvace, Elmer's Glueのようなフィルム形成性ラテックスを使用することにより、本明細書中に記載されているバイオ活性なマクロ分子を効果的に固定することができる。ある場合においては、フィルム形成性ラテックスを使用することにより、グロスセンサーに使用したタンパクマトリックスを用いた場合より、より高感度のセンサーが得られる。

【0246】本発明の実施態様の1つにおいて、酵素ウレアーゼの固定にフィルム形成ラテックスが使用される。この場合、魚ゼラチンから製造したバイオ層を用いたバイオセンサーより高い酵素活性が達成される。

【0247】さらに、ラテックス混合物の適用に先立って、その中にある種の添加剤（例えば、塩類（塩化ナトリウムなど）あるいは糖アルコール（マンニトール、

エリスリトール、ソルビトールなど））を混入することにより、バイオ活性層の多孔性をかなりの程度制御することができる。例えば、ラテックス液1リットル中にソルビトール1gを添加することにより、乾燥状態のウレアセンサーのウェットアップに要する時間を大幅に短縮することができる。また、ウェットアップ時間を短縮することにより、レスポンスをより速くすることが可能である。

【0248】5.3.3. BUNセンサーの性能

第9図は、アンモニウム イオンセンサーのレボンスを、チップ上に形成した参照電極に対する時間関数として示す。この測定は、センサーの乾燥状態から開始された。初期における増加が速いのは、溶液によるセンサーのウェットアップのためである。溶液がその内部に到達した瞬間から、センサーは極めて迅速に反応し、数秒以内に測定を終えることができた。その間、テスト溶液中のアンモニウム濃度は2mMから20mMに変化した。同図中の3本のグラフは、三個の異なるセンサーを用いて得られたものであり、レスポンスが一樣であることを示している。

【0249】第10図には、尿素水溶液に対するBUNセンサーのレスポンスが示されている。初期における出力電圧の低下およびそれに続く出力電圧の上昇は、センサーのウェットアップに基づくものである。約40秒後、ウレア濃度は1mMから10mMに変化した。第3図の構造のセンサーに比しそのレスポンスが速いのは、イオンが指示電極上に到達する前に、外側のフィルム形成性ラテックス層を透過すると共に、該層中で触媒反応が起こることが必要であるからである。尿素濃度の決定に際しては、ニコルスキーの選択係数が考慮される。第11図には、レベルを上げるために尿素をスバビした全血に対するBUNセンサーのレスポンスが示されている。この場合におけるレスポンスも前出のものに類似する。このBUNセンサーは、尿素濃度1mM~20mMの範囲内においてリニアであり、血中濃度40mMまで測定可能であった。

【0250】5.4. 自動化された微小適用システム
本発明によるマイクロ作製法の重要な一面は、バイオセンサーに使用する材料の微小量を、正確かつプログラム可能に適用し得る自動システムを使用する点にある。微小適用システムとしては、ウェム プロパー（Paci fic Western Systems 社製 SPI-C）に基づくものがある。該プロパーには、真空チャックおよびシリンジが備えられており、重要な構成要素である真空チャックおよびシリンジは、それらの垂直、水平、側方および回転位置を独立して制御できる別個の位置制御手段に結合され、節約のため、シリンジは垂直方向にのみ移動可能に構成することもできる。これら構成要素の動作は、慣用のソフトウェア（Turbo-C）を用い、パソコンで制御できる。真空チャックの位置は、*x*および*y*方向に、*z*（土

13ミクロンの精度で再現可能である。

【0251】液滴のサイズは、広い範囲にわたって再現性よく制御可能であり、例えば、液滴体積約5〜約500ナノリットル (nl) において、約5%の精度で液滴を適用することができる。そのためには、精度約0.1%のソレノイドを使用すれば十分である。シリンジのニードル(針)の先端部の位置は、適用量に応じて、パイオセンサーの上方約0.1〜約1mmの範囲とされる。一般に、液滴のポリームが小さい程、センサーとニードルとの間の距離は小さく設定される(係52.4.1.1参照)。

【0252】シリンジのニードルとパイオセンサーの所定領域との正確な位置合わせは、必要ならば、カメラおよびレクチルを用いて行われる。位置合わせ操作は、オペレーターがマニュアルで行ってもよく、人工知能を組み込んだ視認システム等により自動的に行ってもよい。もちろん、デバイス上に材料を適用し得る速度は、上記システムの上記構成要素が所定の位置に到達するのに要する時間によって制限される。したがって、後記のようなマルチプル シリンジ構造を有するシステムを使用するのが有利である。

【0253】第12図を参照すると、図面に示された好ましい微小適用システムは、真空チャック1を有しており、その上にウェハ2と適用すべき液体材料を入れたシリンジが保持されている。液体材料は、10から供給される窒素または適宜の加圧ガスにより、ニードル6から適用される。加圧ガスの流れは、ソレノイドバルブ9によりコントロールされ、その際、ソレノイドバルブは、所定量の材料の適用に要する正確なガスパルスを提供するように作動する。支持アーム7は、シリンジおよびニードルの垂直(z)方向の位置を調節するための手段8に結合されている。適切なバイオ活性材料を含有するフィルム形成性材料は、パイオセンサー チップの所定の領域4上に適用される。前記のとおり、真空チャックは、ウェハの位置を多方向に変化させる手段に結合されている。もちろん、望むならば、手段8を多方向に変位させることもできる。

【0254】第13図には、微量適用システムの他の態様を示した。同システムでは、独立して制御し得る複数の微量シリンジ アセンブリが備えられている。アセンブリは、好ましくは、環状支持体11の上に設置されており、環状支持体の開口12の下には、ウェハおよび真空チャックが配設されている。このようなマルチプルシリンジシステムを使用することにより、パイオセンサー上に2以上の層を同時に形成することもできる。もちろん、このマルチプル シリンジ システムでは、個々のニードルをチップ上の特定領域上に位置させることが必要であるから、位置合わせはより複雑なものとなる。しかしながら、このように複数のシリンジを配置することにより、本発明の主たる目的の一部である均一なマイクロ作製を可能としつつ、微量の液体を適用する上で最大限

のフレキシビリティを獲得することができる。

【0255】5.4.1. 均一膜厚局在化フィルム層の制御可能な微量適用に有用な組成物および方法
5.1.3に簡単に記載したように、微量適用された層の寸法(特に厚さ)は、種々の要因に支配される。より詳細に述べると、本発明者らは、これらの要因としては、液体の適用量および適用方法、液体の組成および表面張力、ならびに液体が適用される表面の自由エネルギー特性がとりわけ重要であることを見出した。以下において、これら要因間の錯綜した関係をより詳しく説明すると共に、より再現性に富み、かつ多様な製作を可能とするため、それらの個別および総合効果を活用し得るかにして述べる。

【0256】5.4.1.1. 液体の微量適用
ここで、1個の液滴でニードルの先端で形成され、ニードルから離れる際の動力学を考察することは有用である。

【0257】液体がニードルの先端から押し出されると、液滴のサイズは、液滴の塊に作用する重力が、液滴とニードルの先端との接触を維持しようとする対抗力を越えるまで成長する。この対抗力には、ニードルの先端と液体との間の付着力、および液体自身の表面張力が含まれる。液体の流速が遅い場合には、液滴の形成が終了した時点における液滴のポリームは一定であることは、既に確立されている。しかしながら、上述した液体関連パラメータの1つを変えるか、ニードル先端部の直径を変え、これにより、液体の付着に利用し得る表面積を変えることによって、上記ポリームを変えることができる。また、本発明者らは、ニードルの外表面を、液体の付着力を変え得る材料でコーティングすることによっても上記ポリームを変え得ることを確認した。例えば、ニードルの先端に疎水性ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) のコーティングを適用することによって、ニードルの先端と液滴との間の付着力が小さくなり、水性ラテックス材料の液滴のナチュラリティが小さくなる。逆に、ニードル先端を親水性材料(例えば、架橋したポリビニルアルコール(PVA))でコーティングすることにより、液滴が重力によりニードルの先端から引き離される前のポリームを大きくすることができる。当業者ならばその他の変更を容易に考得ることは疑いない。そのような変更も、本発明に含まれる。

【0258】コントロールされた微小量を表面に適用することが必要な状況下において、液滴が完全には形成されない(すなわち、液滴が重力により落下することがない)高さにマイクロシリンジを位置させることによって、部分的に形成された液滴と表面を実際に接触させ、これにより液体と表面との間の付着力により液滴を引っ張ることで見出された。ニードルの先端をz方向に十分な距離だけ表面から遠ざけると、液体の集聚力が弱くなり、自然落下による場合よりも少量の液体が、表面上に

接触した状態で残留する。この手法により、自然落下による場合の量の1000分の1またはそれより多い任意の量の液体を再現性よく適用することが可能である。例えば、本発明者は、自然落下による液滴のサイズが8 μ Lである場合において、8nLのグリセリン液滴の適用が可能であることを確認した。

【0259】5.4.1.2. 所定の表面張力を有する液体組成物

純粋な液体に物質を添加することにより、該液体とその蒸気相との表面張力(α)を変え得ることは周知である。例えば、水に脂肪酸を添加すると、脂肪酸分子の親水部が凝集する一方、疎水部は凝集しない(すなわち、高エネルギーの溶解状態にとどまる)。この場合には、分子の溶解部分と表面に移動させるのに最小の仕事量が必要とされないから、表面層は脂肪酸の非凝集部に富む状態となり、表面張力を減じる。

【0260】逆に、水性システムにイオン性塩のような溶質を添加すると、液体中の水分子間の凝集力(イオン-双極子相互作用)が上昇し、イオン性塩を表面に運ぶのに要する仕事量が増大する。これにより、該液体の表面張力が大きくなる。

【0261】本発明の文脈において、接触角の概念について簡潔に論じておくことは好ましい。少量の液体を平坦な表面上に設置すると、該液体は該表面を完全に濡らすことはなく(すなわち、無膜に拡がり続けることはなく)次第に従い、接触角 θ を有する局在化した液滴の状態にとどまる。

【0262】

【数4】

$$\cos \theta = (\alpha_{sv} - \alpha_{sl}) / \alpha_{lv}$$

【0263】ここで、 α_{sv} は表面と気体との表面張力を示し、 α_{sl} は表面と液体との間の表面張力を示し、 α_{lv} は液体/蒸気表面張力を示す。液滴の形状およびその接触角は、液体中の分子間凝集力と、液体-表面間の付着角とのバランスを反映したものとなる。凝集力が卓越する場合には、接触角は大きく、付着角が卓越する場合には、接触角は小さくなる(第15図参照)。親水性液は親水性表面上で明らかに小さい接触角を有し、逆に、疎水性液は大きい接触角を有する。接触角 θ は90°より大きい場合には、表面は水に濡れることがない。表面張力の測定は、簡単な光学装置を使用し行うことができる。

【0264】本発明において微量適用される液体組成物は、コントロールされた最適な表面張力を有するように調整される。必要に応じて、適切な添加剤が使用される。液体の親水性、疎水性も同様にコントロールされる。最終製品に硬化された膜が必要とされる場合には、固型分の含有量および揮発性溶剤の含有量が注意深く調節される。さらに、これらの成分の比を調節することにより、粘度がコントロールされる。

【0265】後記実施例には、所定表面上に微量適用す

るのに適した組成物が記載されている。それらの中には、特に、Cl⁻、Na⁺、K⁺、pH、NH₄⁺、およびCa⁺⁺イオン感応層を形成するための組成が含まれている。一般に、これらの組成物は、平面キャスト法(例えば、スピン塗布)により膜を形成する場合に使用される組成物より、PVCポリマー、可塑剤、イオノフォア、溶剤等をより高い粘度となる状態で含有する。これら高粘度組成物は、膜の変形を伴うことなく硬化または乾燥可能であることが見出された。高粘度において、マトリックスの均一性を保つこと、経時に伴う材料の相分離を防止(すなわち長寿命化)すること等の関連する諸問題は、これらの新規な組成物によって軽減される。また、長期にわたって膜の劣化を防止するため、その他の添加剤を使用することもできる。最後に、適切な表面張力および安定性を備えさせるため、溶媒系が選択される。K⁺、Na⁺、NH₄⁺、pH、およびCa⁺⁺センサーに対しては、可塑剤、PVCポリマーおよびイオノフォアの固型含有量(重量%)は、それぞれ60~80%、15~40%、0.5~3%が好ましい。Cl⁻センサーに対しては、可塑剤25~40%、PVC 25~45%、およびイオノフォア25~35%の割合が好ましい。

【0266】5.4.1.3. 平板状精密の表面エネルギーを調節する方法

本発明者は、予期せざることに、所定の組成と最適な表面張力を有する液体のコントロール量の適用に関する上記諸要因に加え、液体を適用する物体の表面の自由エネルギーを調節することによっても、形成される層の最終ディメンジョン(特に、厚さ)をコントロールできることを、発見した。さらに驚くべきことに、これらの手法を組み合わせることで、所望の結果が再現性よく達成されることが見出された。その結果、極めて多様な方法により、種々の組成および有用性を有するバイオ活性層の配列を形成することができる。

【0267】一例として、電極周辺部から離れて存在するポリイミド層を有する銀/強化銀電極を備えたセンサーについて考察する。今、もし、その表面にテスト液としてグリセリン80%、水20%の混合液を適用したとすると、両者は接触角50°を与える。該表面をテトラフルオロメタンブラスマで前処理すると、ポリイミド表面はより疎水性となり、上記テスト液との接触角は、50°~120°となる。

【0268】逆に、もし、ポリイミド表面を酸素ブラスマで処理すると、その表面は親水性となり、上記テスト液に対する接触角は10°~50°となる。

【0269】ここで図面を参照すると、第15a図には、ポリイミド層で囲まれた銀/強化銀電極の周辺が示されている。第15b図は、同電極の正面図である。第15c、15dおよび15e図に示すように、U₀ブラスマで処理されたポリイミド表面上に存在する親水性液体の接触角 θ は小さい。表面が処理されていない場合には接触角は大

きく、 CF_4 プラズマで処理すると、一層大きくなる。したがって、所定の表面上に適用された液体の形状は、当該表面を処理する（あるいは処理しない）条件を注意深く選択することにより、かなりの程度制御できる。

【0270】一般に、プラズマ処理中には、次の2つの現象が生じる。①表面がエッチングされる（例えば、表面に存在する物質がプラズマと反応し、除去される）、

あるいは②プラズマから表面に物質が堆積する。この場合、表面の性質も、プラズマの性質と同様に重要である。次に、種々の表面に対するプラズマの効果をまとめて掲載した。

【0271】

【表6】

プラズマガス			
表 面	CF_4	CHF_3	O_2, H_2, H_2O, F_2, N_2
二酸化シリコン	エッチング 親水性	堆積 疎水性	エッチング 親水性
ポリイミド	堆積 疎水性	堆積 疎水性	エッチング 親水性
銀	エッチング 親水性	堆積 疎水性	エッチング 親水性

【0272】このような処理は、表面の性質を、非常に濡れ易いものから極めて濡れ難いものまで、コントロールされた態様で、変化させ得るという、明確な利点を有する。処理された表面の実効接触角は、プラズマガスの組成、プラズマの出力、時間、圧力等により決定される。

【0273】先に記載した好ましい液体組成物を微量適用するのに先立って、マイクロ化ベースセンサーおよびポリイミドパッシベーション層を備えたシリコンウエハを、上に記載したようなプラズマ処理に付すことも可能である。この場合、例えばアルゴンプラズマにより表面はエッチングされると共に親水性となる。他方、 CF_4 プラズマによれば、表面は、より疎水性となる。このように表面エネルギーを調節することにより、微量適用された液体（すなわち、膜材料）の拡がりをコントロールすることが可能であり、拡がりをコントロールすることにより、膜厚をコントロールすることができる。そして、膜厚をコントロールすることにより、膜のレスポンス特性を極めて再現性に富むものとすることができる。

【0274】薄い膜（例えば、40~60 μm ）を形成する場合には、適用された液体と表面との接触角が大きくなるように表面を処理することが好ましい。例えば、水性ラテックス膜を適用する前に、表面をプラズマ処理し、水（テスト液）との接触角が50~70°となるように調節する。この点に關し、第16a図に電位差計用アンモニウムセンサーの例を示した。

【0275】薄い膜を形成する場合には、適用された液体との間に小さい接触角が形成されるように調節する（例えば、水溶液を適用して膜厚1 μm のNP酵素層を形成する場合には、接触角は10~30°とすることが好ましい。【第16b図参照】）。

【0276】本発明の一実施態様において、電極表面の

周辺部の表面エネルギーは、リソグラフィにより画成可能なタンパクマトリックスの所定量を適用した際に、所望の膜厚が達成される条件となるように調節される。第16c図に示されているように、形成されたフィルムは、次いで、その所定領域が活性放射線に露光され、被露光領域が現像剤に対して不溶とされる。これを現象に付すことにより、パターン化された層が得られる。したがって、このようにして形成された層のディメンジョン（膜厚）は、スピン塗布では決して達成できない精度でコントロールされる。もちろん、大きい相違点として、この方法を採用することにより、多様なバイオ活性分子を保持した多種の膜を、本発明による理想的なマイクロ作製法の特徴である優れた制御性、再現性を犠牲にすることなく、単一のウェハ上に作成することが可能となる点を挙げることができる。これは、第13図に示したようなマルチプルシリンジアセンブリーを使用して数種のバイオ活性層を同時に適用することが可能であるからである。そのようにして適用された層は、単一の光パターニング処理に付すことにより、電極上の所定の位置に局在化することができる。

【0277】5.5. クレアチニンおよびクレアチンセンサー

後記実施例に、クレアチニンセンサーおよびクレアチンセンサーの好ましい実施態様が記載されている。クレアチニンの分析において固定化酵素の最大活性度を達成するためには、クレアチニンアミドヒドロラーゼおよびサルコシンオキシダーゼをリソグラフィにより画成したゼラチン層中に固定することが好ましい。ついで、クレアチナーゼと、その上に積層したフィルム形成性ラテックス中に固定する。クレアチンセンサーは、ゼラチン層に用いたクレアチニンアミドヒドロラーゼを除くことにより、上記と同様に作製可能である。この例に示されるよ

うに、リソグラフィーにより画成されるゼラチンとフィルム形成性ラテックスとの組み合わせは、容易に形成することができる。

【0278】5.6. その他

本明細書中に記載したセンサーは、使い捨て用分析・検出デバイスに適合したものとする事ができる。リアルタイムで液体を測定するための使い捨てデバイスの例が米国特許出願第07/245,102号に記載されているので参照されたい（なお、同出願の開示事項は、本明細書中に繰り入れられる）。そのような用途に用いるセンサーには、乾燥状態で保存された場合にも十分な保存寿命を有するよう、過剰量の酵素を保持する能力が要求される。また、ウェットアップ、校正および所望の測定をリアルタイム（好ましくは、全体で1分程度以内）で終えることができるように、センサーを構成する層は、十分に薄くかつ十分に透過性でなければならない。グルコースの電流測定用のセンサーについては、校正・測定を行う前に電気触媒に電気イリネスを適用して電気触媒の表面を活性化し、過酸化水素電流を可能な限り大きいものとする事が勧められる。また、これらのセンサーは、電気装置のための静電防止接点（SMART）コネクタの規格に適合させることができる（例えば、米国特許出願第 187,665号参照。なお、同出願の開示事項は参考用として本明細書に組み入れられる）。以下に本願発明の実施例を示すが、これらは、本発明の一般的側面を説明するためのものであり、いかなる意味においても本発明の範囲、有用性を限定するものと解すべきではない。本発明の範囲および精神を実質的に逸脱しない範囲内において、これら以外の態様に取替えることは当業者に明らかであり、そのような態様も本願発明の均等物と見なし得る。

【0279】

【実施例】6.1. グルコースセンサー

6.1.1. 信号線を不動態化したベースセンサーの製作
グルコースセンサーに対する好適な設計は、単一の銀-塩化銀結合基準および対電極によってそれぞれ包囲された2個の同一イリジウム触媒電極を含むユニットセルである（第1図および第2図参照）。3個の電極は各々表面が不動態化された（overpassivated）信号線によって3個のコンタクトパッドのうちの一つに接続されている。ユニットセルは、この場合シリコンウェハである単一基板の上にすくなくとも数百回反復されている矩形領域内に閉じ込められている。

【0280】あらかじめ所望および過酸化水素の濃縮混合液によって慎重に洗浄された、二酸化硅素の表面層（optical, layer）を備える直径4インチのシリコンウェハは、プラズマ堆積システム中に配置される。チタン層（0.1 μm）および銀層（0.5 μm）が、ウェハ表面上に引き続いてスパッタされる。銀は、次に、最終デバイスにおいて結合した基準および対電極として作用する領域に局在するように処理される。この工程は、ウェハ

をボジ形レジスト（シップレイ、AZ,1370,SF）でスピンコートする標準的なリソグラフィー法によって達成される。フォトレジストをマスクを介して紫外線露光し、現像（シップレイ、AZ,351）した後、露光が露出される。腐食液として硝酸第二銀の0.9M水溶液を用いて除去される。そして、N-メチルピロリドン溶液を用いて残ったフォトレジストが除去され、所望の銀構造が露出される。次に、その下にあるチタン層が、コンタクトパッドまたは信号線のいずれかとして作用する領域に材料が残されるように処理される。この処理は、腐食液として0.78Mのフッ化水素酸を含む3.9M硝酸混合水溶液を用いることを除き、銀に対して上述したのと同じリソグラフィー処理を繰り返すことによって達成される。

【0281】信号線を不動態化するために、光処理可能な（photo-definable）ポリイミド（デュボン、2703）をウェハ上にスピンコートする。このウェハを紫外線露光し、ブチラクトンおよびキシレンの混合溶媒（体積比6:4）で現像した後、上記ポリイミドはオープン中で不活性雰囲気下で約350℃で約30分間加熱および「イミド化（imlized）」され、約150℃まで放置冷却してから取り出される。

【0282】イリジウム触媒電極を製作するために、ボジ形フォトレジスト（シップレイ、AZ,1370,SF）で上述のようにパターンが描かれる。次に、イリジウム層（0.1 μm）がウェハ上にスパッタされる。過剰のフォトレジストおよびレジスト上の過剰の金属は、次にN-メチルピロリドンを用いた処理によって除去され、八角形（幅200 μm）のイリジウム層が残される。次いで、60 μMの塩酸を含む塩化クロム酸カリウムの12mM水溶液中にウェハ全体を浸すことによって、銀領域が塩酸処理される。

【0283】触媒電極をグルコースに特異的に感応しやすくするために、ベースセンサー上に付加的な層が形成される。

【0284】6.1.2. 透過選択的（permselective）シラン層
シラン化合物、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメチルシラン、のアルコール溶液が以下のようにして調製される：シラン（2 mL）、水（9 mL）、およびエタノール（90 mL）からなる混合液10gをエタノール50gと混合する。十分な量のこのシランのアルコール溶液をウェハ上にスピンコートする。このウェハは、次にオープン中にて約90-250℃で約30分間焼成される。

【0285】あるいは、シラン層はベースセンサーを造所に有するシリコンウェハの所定領域上（すなわち、触媒電極表面上）に形成することができる。ボジ形フォトレジスト（シップレイ、AZ,1370,SF）の層がウェハ全面にスピンコートされ、約90℃で30分間半焼成（soft-bake）される。次に、それは前述のようにパターン化され、触媒電極上の領域が露出したまま残される。脱イオン水

中のN-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシランの0.5g/dL 溶液がウェハ上にスピコートされ、約90℃で15分間不活性雰囲気下にて焼成される。過剰な重合シランおよびトリメトキシシランは、n-ブチルアセテート中で約15分間超音波処理することによって除去される。フォトリソレジストが除去された後、ウェハは約150℃で15分間加熱される。この「リフトオフ (lift-off)」工程によって、シラン層が触媒電極上に局在化されたウェハが得られる。

【0286】もし望むなら、シラン層はフォトリソレジストキャップによっても局在化して形成できる。典型的な方法を以下に略述する：触媒作用電極が薄膜シリジウム金属であり、基準電極が銀-塩化銀である電流測定式電気化学的センサーのパターン化されたアレイを備えるシリコウウェハは、脱イオン水中のN-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシランの0.5g/dL 溶液でスピコートされる。次に、このウェハは、約160℃に約15分間加熱される。ウェハは、続いてボジ形フォトリソレジスト (シップレイ、AZ, 1370, SF) でスピコートされ、約100℃で約60秒間半焼成 (soft-baked) され、マスクを通して紫外線露光することによってパターンが形成される。レジストは、次に現像され (シップレイ、AZ, 35 1)、触媒シリジウム作用電極上にレジストキャップが残される。次に、ウェハは脱イオン水によるフッ化水素酸 (10M) の500 倍希釈水溶液中でエッチング処理されて、重合した過剰のN-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシランが除去される。他のプロトン性溶媒、たとえば低級アルカノール、をフッ化水素酸に対する溶媒として使用してもよい。プロトン性溶媒の混合液も使用できる。典型的には、プロトン性溶媒中のフッ化水素酸濃度は約0.001 から約0.01重量パーセントのレンジにある。レジストキャップは、次にウェハをn-ブチルアセテートにさし、その後15分間超音波処理することによって除去される。上述の方法は、シラン層を触媒電極上にのみ残留させる。

【0287】別の方法では、フッ化水素酸が関与する湿式エッチング工程を酸素アブレーションを用いるドライエッチング工程で置き換えて、同様の効果を達成する。

【0288】6.1.3. バイオ層の支持マトリックスとしての光硬化可能 (photofixable) な魚ゼラチン
フォトインシテーター (photoinitiator) としてクエン酸鉄アンモニアを含有する光硬化可能な魚ゼラチンは、ニュージャージー州ニューブランズウィックのノーランドプロダクツ社 (Norland Products, Inc.) から購入可能である。これらのキガ形フォトリソレジスト (市販の材料は、NPR の次に整数を続けて参照される) は、魚ゼラチンの水溶液 Sigma Chemical Company によって45%水溶液として販売されている冷水魚皮、カタログ番号G, 776 5)、金属錯体、および交差結合剤を混合することによって新鮮なものが調製される。

【0289】ソルビトールまたはマンニトールなどの糖アルコールも、光硬化されたマトリックスの多孔率を変えるために製剤中に含有させてもよい。上述のように、クロムをベースにしたフォトインシテーターを含み、NPR, 6 として知られている市販の製剤も使用できる。

【0290】酵素生体触媒、グルコースオキシゲナーゼ (本実施例の場合)、はNPR または調整されたばかりの魚グロ混合液中に混合され、ベースセンサーウェハ全体にスピコートされる。典型的な製剤は、約2 から約35 g/dL の魚ゼラチン、約2 から約100mM の金属錯体、約2 から約100mM の交差結合剤、および約1 から約25mg/dL の酵素からなることができる。この製剤は、また、約0.1 から約10g/dL の糖アルコールおよび約0.001 から約1g/dL の洗浄剤を含んでいてもよい。好適な製剤は、10% の魚ゼラチン、13.3mM のクエン酸鉄、13.3mM のN,N'-メチレンビスアクリルアミド、および6.7mg/mL のグルコースオキシゲナーゼからなる。他の適当な製剤は、NPR-29 (脱イオン水によって最終的なタンパク質含有量が全混合液の10重量%まで希釈されたもの)、グルコースオキシゲナーゼ (6.7mg/mL)、ソルビトール (2g/dL)、およびトリリン-X-100 (0.03g/dL) からなる。魚ゼラチンまたはNPR製剤のpHは、炭酸塩または水酸化ナトリウムの添加によって、所望ならば、酵素添加前に約4 以上のpHに調整される。最も好適には、製剤のpHは、生体酵素の重大な不活性化を防ぐために、約4 以上であり、かつ約9 以下であるべきである。

【0291】ウェハ上に塗布されるタンパク質材料の量は、最終的なバイオ層の厚さを調整するために変えることができる。この厚さは、好適には約0.1 μm である。より経済的には、製剤はベースセンサーのインジケータ電極上に直接微量塗布 (microdispense) してもよい。ウェハは、次に適当なマスクを通して紫外線露光 (6mW/cm²、30秒) され、1g/dL 過酸化水素水中で約20秒間現像される。

【0292】あるいは、タンパク質マトリックスは、酵素の存在無しにウェハ上に形成し、パターン化してもよい。ウェハ全体は、次に濃度20mg/mL の酵素グルコースオキシゲナーゼ (シグマ、タイプ: 1501U/mg) の水溶液中に2分間浸漬される。この工程はゼラチン層に十分な量の酵素を含浸させるのに効果的である。過剰の酵素はウェハを水で洗うことによって除去することができる。

【0293】6.1.4. 信号線を不動態化せずクロムをベースにしたNPR マトリックスを用いたグルコースセンサー
グルコースセンサーに対する別の設計は、単一の銀-塩化銀結合基準および対電極によってそれぞれ包囲された2個の同一シリジウム触媒電極を含むユニットセルである (第1図および第2図参照)。3個の電極は、それぞれ不動態化されていない信号線によって3個のコネクタパッドのうちの1つと結合されている。不動態化工程

の省略は、製造工程の数を減少させる。不動感層の不存在は、また、ウェハ上の全体的なグロストボグラフィ (gross topography) を減少させ、ウェハ上に引き続いてスピコンコートされる材料のより良好な厚さ制御を可能にする。上記ユニットセルは、この場合シリコンウェハである単一基板上でまず目状に数百回反復される矩形領域内に閉じ込められている。あらかじめ硫酸および過酸化水素の濃縮混合液によって慎重に洗浄された、局所 (topical layer) が二酸化珪素からなる直径4インチのシリコンウェハは、プラズマ堆積システム中に配置される。チタン層 (0.1 μm) および銀層 (0.5 μm) が、ウェハ表面上に引き続いてスパッターされる。銀は、次に、最終デバイスで結合した基準および対電極並びにコンタクトパッドとして作用する領域に局在するように処理される。この工程は、ウェハがボジ形レジスト (シップレイ、AZ, 1370, SF) によってスピコンコートされる標準的なリソグラフィ法によって達成される。フォトレジストをマスクを介して紫外線露光し、現像 (シップレイ、AZ, 351) した後、露光した銀は腐食液として硝酸第二銀の0.9M水溶液を用いて除去される。そして、N-メチルピロリドン溶媒を用いて残ったフォトレジストが除去され、所望の銀精造が露出される。

【0294】イリジウム触媒電極を製作するために、ボジ形フォトレジスト (シップレイ、AZ, 1370, SF) を上記のようにウェハ上にパターンが描かれ、次に、イリジウム層 (0.1 μm) がウェハ上にスパッターされる。過剰のフォトレジストはN-メチルピロリドンを用いた処理によって除去され、八角形 (幅200 μm) のイリジウム層が残される。次に、その下にあるチタン層が処理され、コンタクトパッドまたは信号線のいずれかとして作用する領域に材料が残される。この処理は、腐食液として0.78 Mのフッ化水素酸水溶液を用いることを除いて、銀に対して上述したのと同じリソグラフィ処理を繰り返すことによって達成される。

【0295】次に、60mMの塩酸をも含む重クロム酸カリウムの12mM水溶液中にウェハ全体を浸すことによって、銀領域が塩酸処理される。残ったフォトレジストは、次に、N-メチルピロリドンを用いて除去される。

【0296】次に、先のセクション6.1.2ですでに述べたフォトリソグラフィ法によって、シラン層がイリジウム電極上に局在化される。シランが被覆されたウェハは約160℃で約15分間焼成された後、7.5g/dL 固体 (solid) に希釈され、濃度20mg/mLの酵素グルコースオキシゲナーゼ (シグマ、タイプ: 1501U/mg) をも含有するノードンNPR材料が厚さ約0.1 μm の被覆を形成するようにウェハ上にスピコンコートされる。適当なマスクを通して紫外線露光した後、酵素含有ネガ形フォトレジストは、水中で現像され、イリジウムインジューター電極の直上に位置する自己整列バイオ層が形成される。

【0297】6.1.5. アナライト減弱 (AA) 層

フェネトールおよびジクロロメタンの混合溶媒 (体積比4:1) 中に溶解されたジメチルシロキサン-ビスフェノールAカーボネート共重合体 (3g/dL 溶液) がウェハ上にスピコンコートされる。続いて、ウェハはアルブミンプラズマ中で10秒間エッチング処理される。次に、NPR (15 g/dL 固体に希釈された) の層 (0.2 μm) がシロキサン共重合体上にスピコンコートされる。セラン層はマスクを通して紫外線で露光され、水中で現像されて、触媒イリジウム電極上およびその下のシロキサン共重合体上に中心を有する幅450 μm の八角形保護キャップが形成される。続いて、過剰の保護されていないシロキサンが湿式エッチング剤 (メタノールおよびイソプロピルアルコール) の混合溶媒 (体積比2:1) 中のテトラメチルアンモニウム水酸化物の1g/dL溶液) によって除去される。ウェハは、次いで洗浄され、さいの目状に個々のセンサーに切断されて、制御された湿度環境のもとに本質的に乾燥状態で保存される。

【0298】前述のように、多くの酵素は上記したのと同様のプロセスによって固定することができる。この技術に熟練した者は、与えられた酵素又は酵素の混合物を固定する可能性を判断するのに最小限の実験を行うだけでよい。魚ゼラチンに加えて他の材料、たとえば牛またはヒト血清アルブミン (BSA またはHSA)、ガンマグロブリン、カゼイン、または他の動物性ゼラチンは、もしタンパク質、交差結合物、フォトインシニエーター、および他の添加物の与えられた組み合わせが適当なネガ形フォトレジスト特性を有していることが見いだされれば、タンパク質源となる。

【0299】6.2. ULR をベースにしたバイオセンサーの作成およびその使用方法

6.2.1. ベースセンサーの製作

あらかじめ硫酸および過酸化水素の濃縮混合液によって慎重に洗浄された、二酸化珪素の局所層を備える直径4インチのシリコンウェハは、プラズマ堆積システム中に配置され、チタン層 (約0.1 μm) および銀層 (約0.5 μm) が、ウェハ表面上にスパッターされる。銀は、次に、最終デバイスで結合した基準および対電極として作用する領域に局在するように標準的なリソグラフィ法によって処理される (たとえば、第17A図、レベル4参照)。このウェハは、ボジ形レジスト (AZ, 1370, SF) でスピコンコートされ、マスクを介してフォトレジストの紫外線露光が行われ、次に現像 (AZ, 351) される。露光した銀は、腐食液として硝酸第二銀の水溶液 (0.9M) を用いて除去される。所望の銀精造を露出させるための残ったフォトレジストの除去は、N-メチルピロリドンを用いて行われる。その下にあるチタン層が次に処理され、コンタクトパッドまたは信号線のいずれかとして作用する領域に材料が残される。この工程は、異なるマスクを用いること、および腐食液として硝酸 (3.9N) およびフッ化水素酸 (0.78M) の混合水溶液を用いることを除

き、銀に対して上述したのと同じソリダグラー処理を繰り返すことによって達成される。信号線を不動化するのために、光処理可能(photo-definable)なポリイミド(デュボン、2703)がウェハ上にスピンコートされる。ウェハが紫外線露光され、フチロラクタンおよびキシレンの混合液(体積比6:4)で現像された後、上記ポリイミドはオープン中で不活性雰囲気下にて約350℃で約30分間イミド化され、約150℃で冷却された後オープンから取り出される。

【0300】触媒電極を製作するために、ボジ形フォトレジスト(AZ,1370,5F)がウェハ上にパターン化され、その後、電極触媒金属がウェハ上にスパッターされる。この堆積は、イリジウムに対しては好適には約0.4nm/secの速度で約20nmの厚さまで行われる。金に対しては、好適な堆積速度はほぼ同じであるが、約100-120nmの厚さまで堆積される。過剰のフォトレジストは、N-メチルピロリドンによる処理によって除去され、八角形(幅200μm)の触媒層が残される(第5図、レベル5参照)。

【0301】次に、ウェハ全体を重クロム酸カリウム(12M)および塩酸(60M)を含む水溶液中に浸すことによって、銀領域が溶解処理される。

【0302】6.2.2. ベースセンサーの後処理
処理の後、ウェハには刻線が施される。たとえば、厚さが約0.46mmのウェハは、約0.18mmのシリコン基板が残るように、センサーの矩形エッチアウト層によって規定されるX軸およびY軸の両方に沿って刻線が施される(途中の深さまでまず目状に切れ目が入られる)。この方法は引き続く工程(たとえば、バイオ層の堆積)のために必要な構造的な一体性を与えつつ、その工程が終了したならばウェハを個々のセンサーに簡単に分離できるようにする。

【0303】上に例示したベースセンサーは、所望のアナライト種に対して親和性を有する層を付加することにより、LLRをベースにしたバイオセンサーにさらに処理される。適当な層を付加するための方法は以下に述べられる。

【0304】6.2.3. ヒトIgGの検出および測定のための層

本実施例は、イリジウムベースセンサー上に2層の付加的な層を有する。すなわち、ジオキシジェンおよび過酸化水素を輸送でき、第2の層が共有結合するアンカーとしても作用するシラン層、および該シラン層に共有結合した免疫活性な第1のメンバーからなる第2の層である。

【0305】ウェハ上にシラン層を形成するために、イソプロパノール:水(体積比92:8)の混合液中のN-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシリランの0.05%/v溶液が刻線が施されたウェハ上にスピンコートされ、オープン中で90℃で20分間焼成される。このウェハは、周囲温度まで冷却される。続いて、この層は先

にセクション6.1.2.で述べたようにしてパターン化される。ウェハは、次にグルタルアルデヒドの1g/dL水溶液中に周囲温度で1時間浸漬され、その後、周囲温度で空気乾燥される。

【0306】0.25M塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.6、中に2.65mg/mLのヤギ抗ヒトIgG抗体(第1のメンバー)を含む溶液(100nL)が、ウェハ上の個々のイリジウム電極上に自動的に微量塗布(microdispense)される。この微量塗布中、ウェハは、乾燥を防ぐために、湿度が制御されたチャンパー中に周囲温度で20分間置かれる。そして、結合していないレセプターは、ウェハを脱イオン水で洗浄することによって除去される。センサーは、次に乾燥状態で保管してもよい。

【0307】6.2.4. アナライト:テオフィリン
金触媒電極を備えるベースセンサーを有するウェハは、第1のメンバーの微量塗布が抗テオフィリン抗体を用いることを除いて、まさにセクション6.2.3.で述べたように処理される。

【0308】6.2.5. 電解質およびガス透過層を下方に備えるヒトIgG用LLRベースバイオセンサー
上述した金触媒電極を備えるウェハは、ネガ形フォトレジストNP6(ニュージャージー州ニューブランズウィック、ノールランド社)の混合液でスピンコートされ、約1μmの厚さを有する層が形成される。この被覆されたウェハは、酸素プラズマに10秒間導入された後、シロキサン-ノンシロキサン共重合体、ペンシルバニア州ペトラーチ(Petrarch, PA)から入手可能なジメチルシロキサンビスフェノールAからボネート(クロロベンゼン中66g/dL)の溶液がウェハ上にスピンコートされ、約0.7μmの厚さを有する層が形成される。ウェハは、再び酸素プラズマに10秒間曝露される。最後に、ネガ形レジストNP6の第2の層が、ウェハ上に約0.7μmの厚さに形成される。

【0309】ウェハは、次に、電極構造上方の領域に対応するマスクを通して紫外線に露光される。ネガ形レジストの一番上の層は脱イオン水中で5秒間現像され、下に位置するシロキサン-ノンシロキサン共重合体層(ガス透過性)をエッチング処理するためのキャップが形成される。共重合体層のエッチングは、メタノールとイソプロパノールの混合液(体積比1:5)中の水酸化カリウムの0.2M溶液で行われる。最後に、最下(第1)層のネガ形フォトレジストが脱イオン水中で現像される。

【0310】ウェハが洗浄され、刻線された後、ヤギ抗ヒトIgG抗体が、先にセクション6.2.3.で述べたようにしてセンサー表面上に、前述にはグルタルアルデヒド交差結合剤によって固定される。こうして形成される構造は、リガンドレセプターすなわち免疫活性性もフォトレジスト層9上に存在していることを除いて、第7A図に示されたものに類似している。

【0311】6.2.6. 別のテオフィリンバイオセンサーセクション6、2、5に記載されたネガ形フォトレジストおよびシロキサン-ノシロキサン共重合体に基づく3層の組は、工程を一つ変更して製作される。第1のNP6層のスピニングの後、ウェハは電極上の所定の領域に対応するマスクを通して紫外線に露光され、次に脱イオン水中で現像される。続いて、第7B図の図まれた構造に合致するようにして、付加的なシロキサン-ノシロキサン共重合体およびNP6層が堆積され、パターン化される。

【0312】洗浄および剥離の後、ウェハは固定されたリガンドレセプター層、この場合抗テオフィリン抗体層、が形成されるようにさらに処理される。最終的な構造は第8B図に図示された構造に類似している。

【0313】6.2.7. ヒトIgG 分析のための分析方法セクション6、2、1、から6、2、3、に記載されているように、親和性が純化されたヤギ抗ヒトIgGは、微細加工されたLLR ベースバイオセンサー上に固定される。ヒトIgG (アナライズ) を含有する試験血清と酵素ラベルが付された抗体 (ヤギ抗ヒトIgG-酵素) を等体積ずつ混合し、得られた混合液の5μLを免疫センサーに加える。アルカリリンフォスファターゼでラベルされた等体積のヤギ抗ヒト免疫グロブリンGと混合された、リン酸緩衝液 (2.5mM 第一リン酸ナトリウム、7.5mM 第二リン酸ナトリウム、および0.145M塩酸ナトリウム、pH7.2) またはヒト免疫グロブリンGを含有する全血のサンプルは、血清サンプルの代わりに用いることができる。セクション6、2、5、に記載されているLLR ベースバイオセンサーも、この方法に適しており、実際好適である。

【0314】免疫センサーおよび混合液は、次に約37°Cで約15分間インキュベートされ、試験血清中のヒトIgGが免疫センサー上に固定されたヤギ抗ヒトIgG (補標レセプター) に結合するようにされる。この免疫センサーは、簡単に洗浄され、非特異結合タンパクがあらそれが除去される。この洗浄は、0.1% (体積比) のトウイーン20 (ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート) を含有する蒸留脱イオン水を用いた第1の洗浄、および脱イオン水のみを用いた第2の洗浄で行うことができる。この洗浄工程は、別法では、アルカリリンフォスファターゼに対する基質である3.0mM インドキシルフォスフェートを含有する溶液を導入することによって達成することができる。この添加によって、結局は過酸化水素が発生され、ジオキシジェンを消費されることになる。発生または消費された電気活性種の量は、血清中のヒトIgGの量に正比例する。ジオキシジェンを消費する分析中で、10ng/mL 免疫グロブリンGの存在を検出することができる。全分析は20分以内に完了する。しかし、分析の感度は、濃度またはインキュベーション時間を変化させることによって調整できることが認識されるであら

う。

【0315】標準曲線は、全体装置の電子メモリ中に、好適には線形関数として記憶することができ、たとえば、先の同時連続米国出願第245,102号参照) 過酸化水素の変化も、好適には、イリジウム金属電極触媒を用いて検出できることが理解される。

【0316】6.2.8. テオフィリン分析のための分析方法

上記セクション6、2、4、および6、2、6、に記載されているように、親和性が純化されたマウス抗テオフィリン抗体は、LLR ベースバイオセンサー上に固定される。テオフィリンを含有する試験血清と酵素ラベルが付されたテオフィリンを等体積ずつ混合する。得られた混合液の一部 (5μL) を免疫センサーに加える。混合液は免疫センサーとともに、次に一定温度で有限時間、たとえば37°Cで15分間、インキュベートされ、サンプル中のテオフィリンが免疫センサー上に固定された抗体に結合するようにされる。この免疫センサーは、次に簡単に洗浄され、非特異結合タンパクがあらそれが除去される。この洗浄は、0.1% (体積比) のトウイーン20を含有する蒸留脱イオン水を用いた第1の洗浄、および脱イオン水のみを用いた引き続き第2の洗浄工程で行うことができる。別法では、アルカリリンフォスファターゼに対する基質である3.0mM インドキシルフォスフェートを含有する溶液を次に添加して洗浄溶液とし、結果として過酸化水素を発生し、ジオキシジェンを消費する。発生または消費された電気活性種の量は、問題の電気活性種の濃度に変化を生じさせ、この変化はサンプル中のテオフィリンの量に反比例する。ジオキシジェンを消費する分析中で、2.5μg/mL以下のテオフィリンの存在を検出することができる。全分析は約20分以内に完了する。分析の感度は、濃度またはインキュベーション時間を変化させることによって調整できることが認識されるであらう。

【0317】6.3. 尿酸センサー

尿酸センサーの好ましい実施例は、グルコースセンサーとして既に説明したベースセンサーを利用する。また、バイオ層はグルコースセンサーのものと同じであるが、このバイオ層の製造は少し異なっている。

【0318】N-(2-アミノエタノール)-3-アミノプロピルトリメトキシシリランのエタノールと水の混合溶液 (9:2:8 v/v/v) による溶液0.3 g/dLがペーゼンセンサーウェル上にスピンドットされ炉で170°Cで15分間焼成される。光形成可能なアイシングラス (Norland NR) が、ユリカーゼ (Toyoco 15mg/mL; 6.53IU/mg) の溶液と混合され (1:4部)、そしてウェハの触媒イリジウム電極上に直接、自動的に微量供給される。この技術によって、触媒イリジウム電極の直径の約3倍の領域のカバーを許容するのに十分な材料が堆積される。乾燥後、触媒イリジウム電極上に直接位置する約

0.6 μm の厚さを有する自己整列し、架橋したゼラチン/ユリカーゼ層をもたらすために、ウェハはマスクを介して、紫外線に露光され、0.6%の過酸化水素溶液中で現像される。フェネトールとジクロロメタンとの混合溶媒(2:1 v/v)に溶解されたジメチルシロキサン-ビスフェノール A カーボネート ポリマーの溶液3 g/dLがウェハ上にスピコートされる。続いて、ウェハはアルゴンプラズマ中で10分間エッチングされる。光形成可能なゼラチン(Norland NPR)の層(1.0 μm)がシロキサン共重合体上にスピコートされる。触媒イリジウム電極の上及び下引きのシロキサン共重合体上に自己整列した保護キャップを形成するためにゼラチン層が紫外線に露光され水中で現像されると、過剰なシロキサンは湿式エッチング剤(メタノールとイソプロピルアルコールとの混合物(2:1 v/v)による水酸化テトラメチルアンモニウムの17 g/dL溶液)によって除去される。そしてこのウェハは洗浄され、個々のセンサーとして切り出され、これらのセンサーは制御された湿度環境下で乾燥保管される。

【0319】6.4. グルコースとコレステロールの同時処理センサー

酵素層を単一の現像ステップで処理された2重分析結合センサーの好ましい実施例がグルコースとコレステロールのためのものとして説明される。

【0320】前記の標準の微細形成技術によって処理された、単一のグルコースセンサーの好ましい実施例におけるシリコンウェハが用いられる。0.46 mmの厚さのウェハは、シリコン基盤の約0.18 mmのみが残るようにセンサーの矩形ユニットセルによって規定されるX及びY軸に沿って部分的に切り出したスクライプされる。この工程は後に続くステップに必要な構造の完全性を提供するが、工程の最後で個々のセンサーにウェハを容易に分離することを許容する。

【0321】このウェハは、0.3g/dLのN-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメチルシロキサン(エタノール:水、99:1、v/v)がスピコートされ、約170℃の不活性雰囲気の下で15分間加熱される。0.07Mの炭酸ナトリウム、2.0/dLのグルシトール、0.033g/dLのTriton X-100 (PBG, Rohm and Haas)、6.7 mg/dLのグルコースオキシダーゼ(Sigma type VII; 150 IU/mg)、及び0.05 mLのアイシングラス(Norland NPR 2.9)を含む混合物(0.15 mL)が触媒イリジウム電極の中心に自動微量供給装置を用いて付着せられる。この体積は、触媒イリジウム電極の直径の凡そ3倍の領域上に液体が広がるように調整される(10-100 nL)。

【0322】次に、上記と同じ成分であるがコレステロールオキシダーゼ(Toyocho type; 261 IU/mg)を6.7 mg/mL含む第2の混合物が、同じ技術によって各センサー

の触媒イリジウム電極に隣接して付着される。

【0323】空気中で乾燥した後、ウェハは触媒イリジウム電極上の領域のみが光を受けるようにマスクを介して紫外線に露光される。そして、触媒イリジウム電極上に自己整列した厚さ約0.5 μm の架橋したゼラチン/酵素層を得るために、ウェハを新たに調製した0.1 g/dLの過酸化水素水溶液中に20分間浸漬して穏やかに振拌する。

【0324】代りに、5 g/dLのSigma製アイシングラス、4 g/dLのクエン酸鉄アンモニウム、6.7 mMのN,N'-メチレンビスアクリルアミド、2 g/dLのソルビトール、0.033g/dLのTriton X-100、及び6.7 mg/mLの酵素(グルコースオキシダーゼまたはコレステロールオキシダーゼまたは両者)からなるアイシングラス組成を指示電極上に微量供給し、30分間露光し(6 mW/cm²)、0.3 g/dLの過酸化水素水溶液中にて約20分間現像することができる。

【0325】ジメチルシロキサン-ビスフェノール A カーボネート コポリマー(0.1g)、ジクロロメタン(17.0 g)、及びジフェニールエーテル(3.0 g)の溶液がここで、触媒電極の直径の約3倍の領域をカバーするように架橋したゼラチン/酵素層上に直接微量供給される。最後に、ウェハは結合されたグルコース及びコレステロールセンサーを与えるように分割される。これらの素子は通常通り乾燥保管される。

【0326】6.5. アデノシン-5-三リン酸センサー
アデノシン-5-三リン酸(ATP)センサーの好ましい実施例は、グルコースセンサー用として既に説明したベ-センサーを用いる。しかし、ウェハは、結合されたグルコースとコレステロールセンサーの好ましい実施例として既に説明したように、パイオ層が付着される前にスクライプされる。

【0327】エタノールと水との混合溶媒(92:8 v/v)によるN-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメチルシロキサン(エタノール:水、99:1、v/v)がベ-センサーウェハ上にスピコートされ、170℃の炉中で15分間焼成される。そして、光形成可能なアイシングラス(Norland NPR 2.9)が、グリセロールキナーゼ(Toyocho 15 mg/mL; 281 IU/mg)及びグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ(Toyocho 15 mg/mL; 84.4 IU/mg)を含む水溶液と混合される(1:4 v/v)。得られた混合物は、ここでウェハ上の触媒イリジウム電極上に直接自動的に微量供給される。触媒イリジウム電極の直径の約3倍の領域をカバーするために十分な材料(10-100 nL)がこの技術によって堆積される。空気中で乾燥した後、ウェハはマスクを介して紫外線に露光され、触媒イリジウム電極上に直接位置する厚さ0.6 μm の自己整列した架橋したゼラチン/2重酵素[bi-enzyme]層を形成するため、マスクを介して紫外線に露光され、0.6 g/dLの過酸化水素水の溶液中で現像される。このウェハ

は次に洗浄され個々のセンサーに分割される。これらの素子は乾燥保管される。

【0328】6.6. アデノシン-5'-三リン酸センサーの代替実施例

アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) センサーの他の実施例もグルコースセンサーのための既に説明したベースセンサーを用いる。しかし、ウェハは前述したようにバイオ層が付着されるまえに部分的にダイスされる。

【0329】エタノールと水の混合溶液 (92:8 v/v) による N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメチキシランの溶液 0.3 g/dL がウェハ上にスピコートされ 170°C の炉中で 15 分間焼成される。フィルム形成ラテックス (Elvace 40711-00, Reichhold) がここでグリセロールキナーゼ (Toyobo 15mg/mL; 2.81U/mg)、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ (Toyobo 15mg/mL; 84.41U/mg)、及びグルタルアルデヒド (2mM) の水溶液と混合される (1:1 v/v)。得られた混合物はウェハ上の触媒イリジウム電極上に直接微量供給される。触媒イリジウム電極の直径の約 2 倍の領域をカバーするのに許容するために十分な材料 (10-100 nL) がこの技術によって堆積される。乾燥後、部分的にダイスされたウェハは洗浄され個々のセンサーに分割される。これらの素子は乾燥保管される。

【0330】6.7. クレアチンセンサー
クレアチンセンサーの好ましい実施例は既に説明したグルコースセンサーのためのベースセンサーを用いる。しかし、バイオ層の形成は異なる。

【0331】エタノールと水の混合溶液 (92:8 v/v) による N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメチキシランの溶液 0.3 g/dL がウェハ上にスピコートされ、170°C の炉中で 15 分間焼成される。ここで光形成可能なアイシングガラス (Norland NPR 29) がクレアチンアミドヒドロラーゼ (Toyobo 15mg/mL; 2.291U/mg) とサルコシンオキシダーゼ (Toyobo 15mg/mL; 4.91U/mg) との水溶液に混合される。この混合物はウェハ上に直接微量供給される。触媒イリジウム電極の直径の約 3 倍の領域をカバーすることを許容するため、十分な材料 (10-100 nL) がこの技術によって堆積される。乾燥後、触媒イリジウム電極上に直接位置する厚さ 0.6 μm の自己整列し架橋したゼラチン/2 重酵素 [bi-enzyme] 層を形成するためウェハはマスクを介して紫外線で露光され、0.6 g/dL の過酸化水素溶液中で現像される。

【0332】フィルム形成ラテックス (ポリ (ビニルアセテート-ビニルアルコール共重合体)、Reichhold がアミノヒドロラーゼ (Toyobo 15mg/mL; 12.81U/mg) に混合される (1:1 v/v)。この混合物は、ウェハ上に既に存在するパターン化されたゼラチン層上に直接自動的に微量供給される。ゼラチン層の直径の約 2 倍の領域を完全にカバーすることを確実にするのに十分な材

料 (10-100 nL) が堆積される。

【0333】乾燥後、あらかじめスクレイブされたウェハは、洗浄され個々のセンサーに分割される。これらの素子は乾燥保管される。

【0334】6.8. クレアチンセンサー
クレアチンセンサーの好ましい実施例は、酵素クレアチンアミドヒドロラーゼが最初のゼラチン層から省略されていることを除いてクレアチンセンサーのそれと全く同じである。

【0335】6.9. 血中尿素窒素 (BUN) センサー
二酸化珪素の局部的な層を過硫酸と過酸化水素との混合物によって丁寧に洗浄されたシリコンウェハはプラズマ堆積装置に配置され、チタニウム (0.1 μm) 及び銀 (0.5 μm) の層がウェハ表面に連続してスパッタされる。銀-チタニウムの 2 層はここで、最終素子においてアンモニウムイオンセンサーとして作用する領域にそれを局在化するための処理が施される。この処理は、ウェハがボジ型レジスト (Shipley 1370 SF) でスピコートされる標準的なリソグラフィ技術によって達成される。マスクを介してフォトリソを紫外線で露光し、現像 (Shipley AZ 351) した後、露光された銀がエッチャントとしての稀酸水溶液 (0.9 mM) によって除去される。下にあるチタニウム層はここで同じフォトリソグラフィック工程の手段により処理されるが、エッチャントとしては硝酸 (3.9M) 及びフッ化水素酸 (0.78M) の混合水溶液が用いられ、残っているフォトリソを除去し所望の八角銀構造 (幅約 150 μm) を露出するために N-メチルピロリドン溶剤が用いられる。

【0336】信号線をバンプ化するために、光形成可能なポリイミド (Dupont 2703) がウェハ上にスピコートされる。ウェハが紫外線で露光され、ブチラクトンとキシレンとの混合溶剤で現像されると、ポリマーが 350°C の不活性雰囲気の中で 30 分間焼成され、取り出す前に 150°C に冷却されるまで放置する。

【0337】この銀は、ウェハ全体を重クロム酸カリウム (12mM) 及び塩酸 (60mM) の水溶液中に浸漬することにより塩化銅化される。これらのパターン化された塩化銀電極上にアンモニウムイオン感知メンブレンが配置される。このメンブレンの材料は低分子量の PVC (Sigma) と高分子量のカルボキシル化された PVC (Type Geon, Goodrich) (1:1 w/w) をシクロヘキサン、プロピオフェノン、及び N-メチルピロリドンの溶剤系 (1:1:1 v/v/v) に全固形成分 10 g/dL の溶液となるように溶解せしめることにより作成される。溶解液は混合物を 70°C で 30 分間加熱することにより造成される。この混合物は、可塑剤トリ (2-エチルヘキシル) ホスベート (Fluka) が、35 g/dL の全固形成分を与えるように加えられ

る。ここで、得られた混合物は45℃まで冷やされ、混合物中の全固形成分の2%に等しい量だけノナクタン (nonactin) (Fluka) が加えられる。

【0338】10-100 nLのこの最終材料は、少なくとも30 μmだけ全ての側で重なるように、ウェハ上の塩化銀指示電極のそれぞれの上に室温で微量供給される。60℃のホットプレート上に30分間このウェハを載置することによって硬化が達成される。この工程は、安定で、約15 μmの厚さを有する丈夫な構造を提供する。このウェハはここで、結合されたグルコース及びコレステロールセンサーの好ましい実施例として既に説明したように、洗浄され部分的にダイスされる。

【0339】ウレアゼ (30 mg; 90 IU/mg Sigma) が清いイオン化された水 (60 mg) に溶解される。この溶液に、1.0 mgのソルビトールと150 mgのポリ (ビニルアセテート-エチレン共重合体) ラテックス (type ELVACE 40711-00, Reichhold) とが加えられる。混合した後、30 mgの1%のグリタルアルデヒド水溶液を加えられ、得られた混合物は攪拌される。ここでこの混合物は、少なくとも30 μmだけ全ての側でラテックス混合物が重なり合うことを確実にするようにそれぞれのアンモニウムイオン感知メンブレインの上に微量供給される (10-100 nL)。この最終メンブレインは約50 μmの厚さを有する。このウェハはここで固いセンサーを形成するように分割され乾燥保管される。

【0340】6.10. 微量供給可能なメンブレインの組成
以下の組成は、イオン感知層を制御可能な方法で形成する目的で微小注射器組み立て体に装填することができる。この微小注射器組み立て体は、好ましくは内径150 μm及び外径300 μmを有する20から30ゲージの針 (EFD Inc.) が装着されている。典型的には、延長部材およびノードルチップを含む微小注射器はステンレス鋼のような金属材料からなっている。この明細書の他の箇所でも述べたように、その表面特性を変えるために針に付加的な層を被覆することができる。また、針の本体自体の製造に合成ポリマーのような他の材料を用いることができる。発明者等は、電極表面の前処理及び付加する液体の量に応じて1から200 μmの範囲の厚さのメンブレイン層が一貫して得られることを見いだした。

【0341】6.10.1. カリウムイオンメンブレイン
重量: 3.55g NMP (N-メチルピロリドン)
2.67g プロピオフェノン
2.67g シクロヘキサノン
4.00g ビス (2-エチルヘキシル) セバケート
バイレックスピーカー内でこれらの成分を組み合わせ、好ましくは磁気攪拌器で混合する。1.33gのPVCを加える。溶液を100℃に加熱し1時間保つ。159

mgのバリノマイシンを加え15分間攪拌する。40℃まで冷やし保管容器に移す。

【0342】6.10.2. 塩素イオンメンブレイン
重量: 0.95g シクロヘキサノン
1.77g プロピオフェノン
0.47g 5-フェニル-1-ベンタノン
バイレックスピーカー内でこれらの成分を組み合わせ、好ましくは磁気攪拌器で混合する。0.47gのPVC Sigma P-9401を加えゆっくり攪拌する。溶液を100℃に加熱し30分間保つ。0.20gのトリオデシルメチルアンモニウムクロライド及び0.20gのケマミンBQ-9702C脂肪アミンを加える。加熱しながら15分間攪拌する。40℃まで冷やし保管容器に移す。

【0343】6.10.3. ナトリウムメンブレイン
重量: 3.81g NMP
2.86g プロピオフェノン
2.86g シクロヘキサノン
4.00g トリス (2-エチルヘキシル) ホスファート
バイレックスピーカー内でこれらの成分を組み合わせ、好ましくは磁気攪拌器で混合する。1.71gのPVP (Geon137) を加える。溶液を100℃に加熱する。1gのシクロヘキサノンに溶解された100mgのメチル モネンシン (Methyl Monensin) を加える。40℃まで冷やし保管容器に移す。

【0344】6.10.4. アンモニウムメンブレイン
重量: 1.38g NMP
1.04g シクロヘキサノン
1.04g プロピオフェノン
1.65g トリス (2-エチルヘキシル) ホスファート
バイレックスピーカー内でこれらの成分を組み合わせ、好ましくは磁気攪拌器で混合する。0.281gのPVC Geon137及び0.545gのPVC Sigma P-9401を加える。溶液を100℃に加熱し1時間保つ。50mgのノンアクトン (nonactin) を加え15分間攪拌する。40℃まで冷やし保管容器に移す。

【0345】6.10.5. ウレアゼメンブレイン
0.29gの10%アンバーガム (ambergum) 溶液
0.30gの10%BSA溶液
0.11gのウレアゼ
これらの成分は硝子びんの中で混合され、15分間穏やかに恒温ぜられる。この溶液は24時間放置される。この期間の後、遠心分離される。上澄みのウレアゼ溶液が静かに注がれ保存される。

【0346】このウレアゼメンブレインの組成は0.028gの前記のとおり準備されたウレアゼ溶液0.285gのElvace 0.034gの清いイオン化された水を加え混合することにより得られる。

【0347】この成分は硝子びんの中で混合され、数分

間種やかに撹拌される。そして、アンバーム溶液 (0.03g)、続いて1%のグルタルアルデヒド溶液 (0.011g) が加えられる。得られた混合物は5分間撹拌される。この組成は、使用前に約0.5時間放置される。そしてウレア-ゼメンブレンはアンモニウムイオン感知メンブレンの上に形成される。

【0348】6.10.6. pHメンブレン
pH感知メンブレンを形成するのに適した組成は同体種のシクロヘキサノンとプロピオフェノンを組み合わせることにより用意される。この混合溶剤1.5gに撹拌し、穏やかに暖めながら、四フェニルホウ酸ナトリウム (5mg)、トリドデシルアミン (75mg)、ジプチルセバシン酸 (620mg)、及び最後に、300mgの高分子量HMW PVC が加えられる。また、 α -ニトロフェニルオキシルエーテル (620mg) をジプチルセバシン酸の代わりに用いることができる。得られた複合物は使用前に完全に混合される。

【0349】6.10.7. カルシウムイオンメンブレン
2.75gの50/50シクロヘキサノン/プロピオフェノン溶液混合物にp-テトラオキシルフェニルホスフェートジエステル、カルシウム塩 (110mg) が加えられる。混合物はここでカルシウム塩を溶解し易くするために穏やかに撹拌され暖められる。この混合物は0.45mm PTFE フィルタを介して濾過される。そして暖かい濾過液に撹拌しながら580mgのHMW PVC (または、代わりに200mgのCOOカルボキシル化されたPVC及び380mgのHMW PVC) が加えられる。溶液が得られた後、n-ジオキシルフェニルホスホン酸 (1300mg) が加えられる。この混合物は溶液が得られまで必要に応じて穏やかに暖めながら撹拌される。

【0350】6.11. ウェハ表面の前処理及び選択されたメンブレンの堆積
パターン化されたポリイミドパッシベーション層を持つ数

百のベースセンサーを含むウェハを処理するために以下の条件が使用される。ウェハは、最初にアルゴンプラズマ続いてCF4プラズマで蝕刻される。既に説明したように、疎水性または親水性の程度は電力またはガス流量を調整することによって、または露出の時間を変えることによって変化させることができる。この特別の例においては、処理された表面はかなり疎水性である。

【0351】

装置: Tegal プラズマエッチャー
温度: 16°C
アルゴンプラズマ
流量: 14.4 sccm
処理圧力: 100mT
前進電力: 200W
反射電力: 10W以下
時間: 30秒

CF4 プラズマ
17PSIGでCF4 を供給
流量: 66 sccm
処理圧力: 800mT
前進電力: 30W
反射電力: 10W以下
時間: 30秒

処理後、ウェハは消イオン化された水で洗浄され、十分な脱水を確保するためにホットプレート上で乾燥される。このウェハはここでダイシングテープを有するフィルム枠にマウントされ適当に配列された個々のセンサーを提供するように既に説明したようにグイスされる。

【0352】そして、各メンブレンを形成するため堆積された一滴またはそれ以上でメンブレンを堆積するため微量供給系が使用される。原素層は予め形成されたNH4+メンブレン上に供給される。微量供給工程は制御された低湿度環境で実施されることが好ましい。

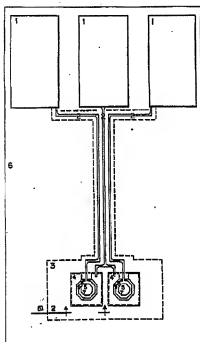
【表7】

メンブレン	好ましい厚さ	最小厚さ
K ⁺	40 ± 20 μm	20 μm
Na ⁺	30 ± 10 μm	20 μm
NH4 ⁺	15 ± 5 μm	10 μm
Cl ⁻	40 ± 20 μm	20 μm
pH	40 ± 20 μm	20 μm
Ca ⁺⁺	40 ± 20 μm	20 μm
ウレア-ゼン素	45 ± 15 μm	30 μm

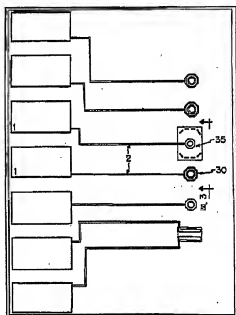
【0353】プレーナー構造の表面自由エネルギーを変えるための他の方法が当業者に知られていることに留意しなければならない (例えば、Wolf, S. and Tauber, R. N., Proceeding Technology, Vol. 1, Lattice Press (1986) または Moss, S. J. and Ledwith, A., The Chemistry of

fthe Semiconductor Industry, Blackie (1987) 参照)。これらの方法は、限定はされないが、湿式エッチング、ドライ (プラズマ) エッチング、プラズマ重合及び堆積、粒子線露光、反活性イオンエッチング、コロナ処理、マイクロウェーブ、紫外線、ラングミュアープロジ

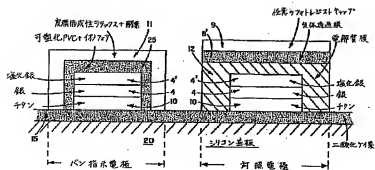
【图1】



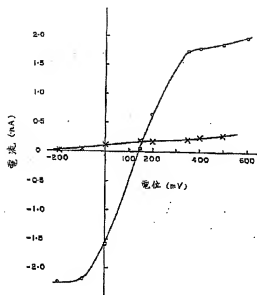
【図4】



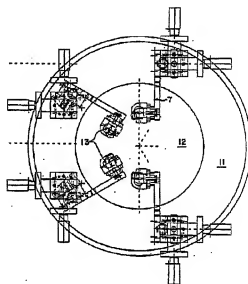
【圖3】



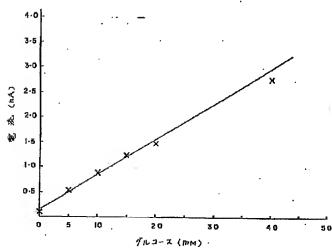
【図5】



【図13】

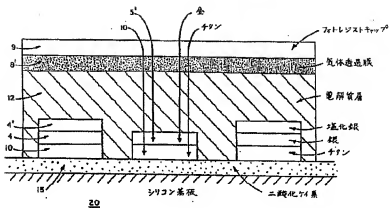


【図6】

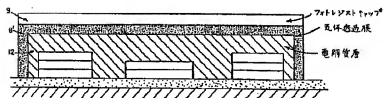


【図7】

7A

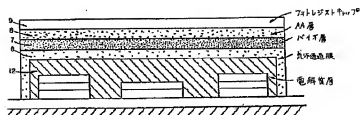


7B

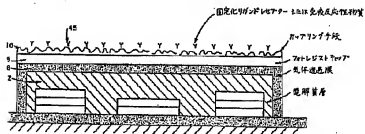


【図8】

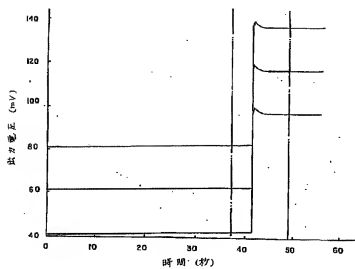
8A



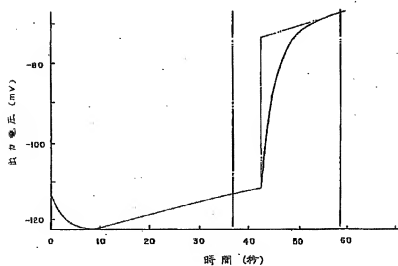
8B



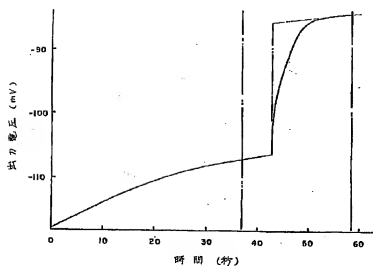
【図9】



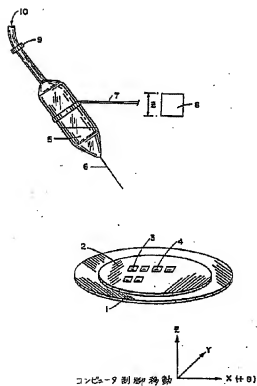
【図10】



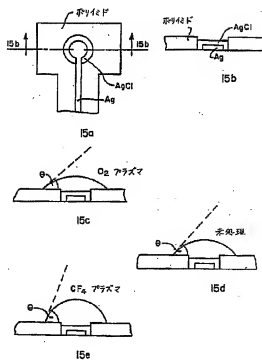
【図11】



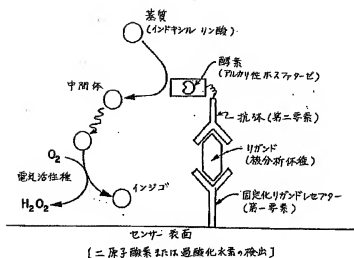
【図12】



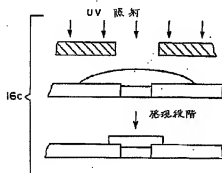
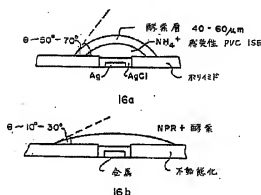
【図15】



【図14】



【図16】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テマード (参考)
		G O I N 27/30	3 5 3 B 3 5 3 C 3 5 3 P 3 5 7
		27/46	3 3 6 B 3 3 8
(72) 発明者	デイヴィス, グラハム アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08536, プレインスボロ, フォックス ランドライヴ 15-04	(72) 発明者	ビッツニック, シルヴィア アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08527, ジャクソン, コリン コート 12
(72) 発明者	アイタック, ジーン, エー. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08619, ハミルトン, ルハーヴ コート 19	(72) 発明者	スミット, ニコラス アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08520, ハイスタウン, ストックトン ストリート 198
(72) 発明者	ロークス, イマンツ, アール アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19067, ヤードレイ, ヤードレイ-モリ スヴィル ロード 1011	(72) 発明者	ステイナー, スーザン, ジェー. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08619, トレントン, ブライトン ドラ イヴ 107
(72) 発明者	マイアー, ランドール, エム. アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19067, モリスヴィル, ラファイエット アヴェニュー 123	(72) 発明者	ヴァンダーワーフ, ボール アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08550, プリンストン ジャンクション, ナソー プレイス 32
		(72) 発明者	ウィエック, ヘンリー, ジェー. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08536, プレインスボロ, バーカー ロ ード 31